

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Extracción y valoración del residuo fibroso y de la fracción
proteínica de la planta desgranada de *Pisum Sativum* L.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Carmen Alzueta Lusarreta

DIRECTOR:

Gaspar González González

Madrid, 2015

TP
1983
143

María del Carmen Alzueta Lusarreta



x-53-075822-0

EXTRACCION Y VALORACION DEL RESIDUO FIBROSO Y DE LA FRACCION
PROTEINICA DE LA PLANTA DESGRANADA DE PISUM SATIVUM L.

Departamento de Agricultura y Economía Agraria
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

143/83

© M^a del Carmen Alzueta Lusarreta
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-19416-1983

MARIA DEL CARMEN ALZUETA LUSARRETA

"EXTRACCION Y VALORACION DEL RESIDUO FIBROSO Y DE LA
FRACCION PROTEINICA DE LA PLANTA DESGRANADA DE --
PISUM SATIVUM, L."

Director: Prof.Dr.Don Gaspar González
González, Catedrático de --
Agricultura y Economía Agra
ria de la Facultad de Vete-
rinaria de la Universidad -
Complutense de Madrid.

Ponente: Prof.Dr. Don Carlos Vicente
Córdoba, Catedrático de Fi-
siología Vegetal de la fa-
cultad de Biología de la --
Universidad Complutense de
Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
CATEDRA DE AGRICULTURA Y ECONOMIA AGRARIA
FACULTAD DE VETERINARIA
CATEDRA DE FISIOLOGIA VEGETAL
FACULTAD DE BIOLOGIA

MADRID 1981

-I-

A mi marido y a mis
padres.

A G R A D E C I M I E N T O

Mi más profundo agradecimiento al Prof. Dr. D. Gaspar González González, bajo cuya dirección se realizó este trabajo de Tesis Doctoral por la cuidadosa y paciente atención que me prestó a todo lo largo del mismo.

Mi profundo agradecimiento también al Prof. Dr. D. Carlos - Vicente Córdoba, Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, quién amablemente accedió a la ponencia de esta tesis.

También tengo que agradecer al Dr. D. Jesús Treviño Muñoz, - Investigador Científico del Instituto de Alimentación y Productividad Animal del C.S.I.C., su ayuda moral y material en muchos momentos y partes de la misma, y a otras muchas personas tanto de la Cátedra de Agricultura como del mencionado Instituto, la decisiva colaboración que me prestaron, muy especialmente a la Srta. Honorina Franco Cascón por su paciente labor mecanográfica.

Finalmente, tengo que expresar mi reconocimiento al P.F.P.I. por la beca que me concedió.

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES DE TERMINOS UTILIZADOS.

- PB = Proteína bruta (Weende N Kjeldahl x 6,25)
- FND = Fibra Neutro-detergente (Van Soest y Wine)
- FAD = Fibra ácido-detergente (Van Soest y Wine)
- LP = Lignina-permanganato (Van Soest y Wine)
- LA = Lignina-ácido sulfúrico (Van Soest y Wine)
- DMS = Digestibilidad de la materia seca.
- UA = Unidades alimenticias.
- DA = Digestibilidad aparente.
- DV = Digestibilidad verdadera.
- VB = Valor biológico.
- UNP = Utilización neta de la proteína.
- PER = Coeficiente de eficacia protéica ("protein efficiency ratio").

Residuo fibroso: parte remanente de los vegetales verdes, después -
de haberles extraído mecánicamente la fracción zumo. Se le dan también otros nombres: pulpa, torta, etc.

Zumo: líquido celular conteniendo proteína y cloroplastos suspendidos, que se extrae de los vegetales verdes por procesos mecánicos que implican generalmente trituración y prensado. Se --
suele llamar también: jugo, jugo total.

Suero: parte líquida que se separa al coagular la proteína del zumo. En la bibliografía recibe los nombres de: solubles, jugo desproteinizado. Nosotros preferimos el de suero por analogía con el que se separa de la leche al elaborar el queso. (Diccionario de la Real Academia de la Lengua).

Concentrado protéico foliar (CPF): fracción rica en proteína que se separa del zumo extraído de los vegetales verdes por medio de precipitación -química o por calor-. Al coágulo húmedo se le denomina cuajada. A pesar del calificativo "foliar", frecuentemente no sólo procede de las hojas, sino de toda la parte aérea de la planta. Abreviadamente le llamamos CPF; en la bibliografía también se conoce por CPV (concentrado protéico vegetal) y en la literatura anglosajona por LPC ("leaf protein concentrate").

Coficiente de extracción: proporción del vegetal original que aparece en la fracción zumo, expresada en porcentaje. Puede referirse a diferentes componentes: substancia seca, nitrógeno total, proteína bruta, etc. Este término puede calificarse para referir el peso de un componente en otra fracción distinta del zumo (CPF, etc.), con relación al peso del mismo en el vegetal original, expresado en porcentaje .

$$\text{Coef. de extrac. de substancia seca} = \frac{\text{Peso de la substancia seca en el zumo}}{\text{peso de la substancia seca en el vegetal original}} \times 100$$

$$\text{Coef. de extrac. de S.S. en el CPF} = \frac{\text{Peso de la substancia seca en el CPF}}{\text{Peso de la S.S. en el vegetal original}} \times 100$$

Coficiente de separación: proporción de zumo que aparece en el CPF, expresado en porcentaje. Puede definirse para la substancia seca, nitrógeno total u otro componente específico, ej.:
Coficiente de separación de la substancia seca.

I N D I C E

	<u>Páginas</u>
1.- <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1.- NECESIDADES Y DEMANDA DE PROTEINA	2
1.2.- LAS PROTEINAS FOLIARES COMO FUENTE DE PROTEINA ALI- MENTARIA	7
1.3.- LOS SUBPRODUCTOS VEGETALES COMO FUENTE DE PROTEINA ALIMENTARIA	10
1.4.- EL GUISANTE, <u>Pisum sativum</u> , L., COMO FUENTE DE PRO- TEINA	13
2.- <u>MATERIAL Y METODOS</u>	24
2.1.- MATERIAL	25
2.1.1.- Variedad de guisantes utilizada	25
2.1.2.- Parcela experimental	26
2.1.3.- Preparación del terreno, siembra y tratamientos posteriores	26
2.1.4.- Recolección y toma de muestras	27
2.1.5.- Control de rendimientos y relación legumbre/res- to planta y grano/vaina	27
2.2.- METODOS	28
2.2.1.- La extracción de la proteína. Fundamentos	28
2.2.1.1.- Ruptura celular	29
2.2.1.2.- Prensado: separación del extracto y la fibra	29
2.2.1.3.- Separación de la proteína del extracto. Coagulación	31
2.2.2.- Análisis químico-bromatológicos	34
2.2.2.1.- Humedad	36
2.2.2.2.- Análisis de N total	36
2.2.2.3.- Nitrógeno no-protéico	36
2.2.2.4.- Extracto etéreo	37
2.2.2.5.- Fibra neutro-detergente (FND)	37
2.2.2.6.- Fibra ácido-detergente (FAD)	38
2.2.2.7.- Celulosa y lignina	38
2.2.2.8.- Hemicelulosas	39

	<u>páginas</u>
2.2.2.9.- Cenizas y minerales	39
2.2.2.10.- Análisis de aminoácidos	40
2.2.3.- Valoración nutritiva	40
2.2.3.1.- Digestibilidad de la sustancia seca, valor D y unidades alimenticias	40
2.2.3.2.- Digestibilidad, valor biológico y utilización neta de la proteína	43
2.2.4.- Análisis estadístico	48
3.- <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	49
3.1.- RENDIMIENTOS Y COMPOSICION DE LA COSECHA	50
3.1.1.- RENDIMIENTOS	50
3.1.2.- PARTICION DEL NITROGENO EN LA SUBSTANCIA SECA	50
3.2.- RENDIMIENTOS Y COMPOSICION DE LAS FRACCIONES ...	54
3.2.1.- <u>RESIDUO FIBROSO</u>	61
3.2.1.1.- RENDIMIENTOS	61
3.2.1.2.- PARTICION DEL NITROGENO EN LA SUBSTAN- CIA SECA	61
3.2.1.3.- COMPOSICION QUIMICO-BROMATOLOGICA.....	65
3.2.1.3.1.- Fibras neutro y ácido-detergente, lignina y celulosa	65
3.2.1.3.2.- Extracto etéreo	68
3.2.1.3.3.- Cenizas y minerales	70
3.2.1.4.- VALORACION NUTRITIVA	70
3.2.2.- <u>ZUMOS</u>	77
3.2.2.1.- RENDIMIENTOS	77
3.2.2.1.1.- Influencia del pH en los rendi- mientos	77
3.2.2.1.2.- Rendimientos en sustancia seca..	81
3.2.2.2.- PARTICION DEL NITROGENO EN LA SUBSTAN- CIA SECA	82
3.2.2.3.- USOS ALTERNATIVOS DEL ZUMO	88
3.2.3.- <u>CONCENTRADO PROTEICO</u>	91
3.2.3.1.- RENDIMIENTOS	91
3.2.3.1.1.- Sustancia seca	91

	<u>Páginas</u>
3.2.3.1.2.- Proteína bruta	91
3.2.3.2.- PARTICION DEL NITROGENO EN LA SUBSTANCIA SECA	95
3.2.3.3.- COMPOSICION QUIMICO-BROMATOLOGICA	100
3.2.3.3.1.- Proteína bruta	101
3.2.3.3.2.- Extracto etéreo	101
3.2.3.3.3.- Fibras neutro y ácido-detergente y hemicelulosas	103
3.2.3.3.4.- Cenizas y minerales	103
3.2.3.3.5.- Composición aminoacídica y aminoáci dos limitantes	104
3.2.3.4.- VALORACION NUTRITIVA	112
3.2.3.4.1.- Resultados	112
3.2.3.4.2.- Discusión de los resultados	113
4.- <u>CONCLUSIONES</u>	133
5.- <u>RESUMEN</u>	137
6.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	141

1. INTRODUCCION

I.1.- NECESIDADES Y DEMANDA DE PROTEINA.

Desde que MALTHUS en 1798 publicara su famoso ESSAY ON THE PRINCIPLE OF POPULATION, constituye un motivo de universal preocupación la situación y el futuro de la alimentación de la humanidad. Respecto a la primera son continuas las referencias al hecho de que más de $\frac{1}{2}$ de la humanidad se encuentran insuficientemente alimentados. La situación futura no parece clara en modo alguno, tanto por el incremento incesante de la población (1), como por el hecho de que este incremento tiene lugar sobre todo en los llamados países en desarrollo, fuertemente deficitarios ya en alimentos (2).

La escasez de alimentos a escala mundial supone principalmente una insuficiente ingestión de energía y de proteína (3) por parte de la población. Se citan con frecuencia ciertas deficiencias específicas (de aminoácidos esenciales, de minerales y de vitaminas), pero en la mayoría de los casos se hallan ligadas a una de aquellas y siempre afectan a mucho menor número de personas. En consecuencia, a dicha escala mundial el problema básico es incrementar las disponibilidades de energía y de proteína alimenticias. A este respecto, utilizando como base de cálculo los dos tipos de exigencias, calóricas y proteínicas, las estimaciones realizadas por algunos organismos oficiales indican que para suministrar unas 2.400 Kcal y 35,1 g de proteína por cabeza y día (cifras que no se alcanzan como media mundial en la actualidad) para 1985 sería preciso aumentar el suministro total de alimentos en un 55 por 100, es decir, en algo más del 2 por 100 anual, y el de proteínas en un 60 por 100 sobre las necesidades de 1970.

Si nos concretamos a Europa la situación se plantea en términos distintos:

Según WACHTER (1978), la Comunidad Económica Europea importa alrededor del 8 % de lo que necesita para alimentación animal, que se reparte en: cereales (60 %), tortas de oleaginosas (30 %) y --- otras materias primas (10 %). Si se valora la riqueza en proteína bruta de los cereales en un 10 % y la de las tortas oleaginosas en un 40 %, y la energía de ambos productos en $3640 \text{ Kcal kg}^{-1}$ y $3500 \text{ Kcal kg}^{-1}$, respectivamente, éste representa una importación de unos 76 millones de Gcal y ~~4.540.000~~ Tm de proteína.

Hay que señalar que la utilización de los cereales en la Comunidad Económica Europea, tiende a disminuir (-0,5 %) anualmente - - mientras que la producción, por el contrario, muestra una tendencia a aumentar (+ 1,5 %). En cuanto a la demanda de tortas proteínicas, la dependencia exterior es cada vez mayor puesto que la demanda aumenta alrededor del 2,6 % por año, a pesar de los progresos realizados en alimentación por el uso de aminoácidos de síntesis.

La situación alimentaria de la población española, en lo que a los parámetros exigencias calóricas y proteínicas se refiere, parece satisfactoria (VARELA y col, 1971), pero hay que señalar que esto sólo se consigue a base de importaciones. Según datos oficiales (Tablas 1, 2 y 3) y utilizando los mismos valores aproximados que - en el párrafo anterior para granos de cereales y tortas oleaginosas y $3180 \text{ Kcal kg}^{-1}$ y 25 por 100 de proteína para granos de leguminos-- sés (4), que son los tres grupos de productos alimenticios de ori-- gen vegetal que principalmente se importan, a partir de los datos - de GONZALEZ (1974) que nosotros hemos actualizado (Tablas 1, 2 y 3), nuestro déficit de productos alimenticios vegetales, como media de los últimos cinco años, asciende a unos 21 millones de Gcal (5) y a

Tabla nº 1.- BALANCE DE LA EXPORTACION DE ALIMENTOS VEGETALES (000 de Tm)

Producto	1973	1974	1975	1976	1977	Medias (b)
Arroz	48,419	45,515	48,811	8,611	81,804	46,632
Trigo (x)	202,128	84,283	7,543	7,630	34,356	67,188
Centeno	0,002	0,044	0,064	0,051	0,059	0,044
Melz	1,278	0,931	1,900	1,465	2,085	1,531
Sorgo	0,334	0,041	0,079	0,041	0,058	0,110
Cebada	58,323	6,733	34,397	254,537	2,814	71,360
Avena	14,716	0,108	0,177	0,148	1,011	3,232
Gerbenzos	0,292	2,256	0,146	0,249	0,473	0,683
Judías	5,409	10,023	0,795	5,652	9,265	6,228
Lentejas	3,343	3,850	5,461	4,115	9,830	5,319
Soja (grano)	-	-	-	-	-	-
Torte y H. de soja	-	-	0,495	-	0,160	0,131
Otras tortas y harinas (oleaginosas)	-	0,100	-	-	17,478	3,515

FUENTE: Anuario Estadístico de la Producción Agraria.

(x) Inclusive la harina en equivalente grano. Coeficiente de conversión de trigo de harina = 0,72

Tabla nº 2.- BALANCE DE LA IMPORTACION DE ALIMENTOS VEGETALES. (000 de Tm).

Producto	1973	1974	1975	1976	1977	Medias
						(a)
Arroz	0,104	0,003	0,001	0,001	0,007	0,023
Trigo(x)	1,626	29,997	22,721	68,730	210,243	66,663
Centeno	-	0,096	0,596	0,098	7,407	1,639
Mafz	2,717,636	4,102,569	4,181,669	3,540,182	4,121,644	3,732,740
Sorgo	194,016	39,582	529,877	416,351	567,622	419,689
Cebada	1,861	128,018	6,145	0,773	0,417	27,442
Avena	-	0,060	0,30	0,006	0,001	0,019
Garbanzos	37,632	24,745	30,375	31,928	28,538	30,643
Judías	7,715	2,432	14,918	9,268	9,628	8,792
Lentejas	5,202	2,773	3,934	8,563	5,498	5,194
Soja (grano)	834,538	1,587,871	1,736,914	1,940,573	1,835,283	1,587,035
Torta y H.soja	381,164	162,961	199,471	581,120	425,356	350,014
Otras tortas y harinas (oleaginosas)	27,960	3,754	-	0,049	0,385	6,429

FUENTE: Anuario Estadístico de la Producción Agraria.

(x) Inclusive la harina en equivalente grano. Coeficiente de conversión de trigo a harina = 0,72.

Tabla nº 3.- SALDO DEL BALANCE DE LA IMPORTACION Y EXPORTACION
DE ALIMENTOS VEGETALES. (a. - b)

<u>Producto</u>	<u>Importación</u>	<u>Exportación</u>
Arroz		46,609
Trigo		0,525
Centeno	1,595	
Maíz	3.731,209	
Sorgo	419,479	
Cebada		43,918
Avena		3,213
Garbanzos	29,960	
Judías	2,564	
Lentejas		0,125
Soja (grano)	1.587,035	
Torta y harina de soja	349,883	
Otras tortas y harinas oleaginosas	2,914	

951.820 Tm de proteína, habiéndose duplicado dicho déficit, respecto al del lustro inmediatamente anterior. Esta tendencia no se ha corregido y en la actualidad el déficit es aún mayor, cubriéndose, como en épocas anteriores, mediante onerosas importaciones.

Esta situación deficitaria ha obligado a intensificar la búsqueda de otras fuentes de proteína no convencionales, tanto para la alimentación humana como para la alimentación animal. De este modo se están derivando hacia la alimentación humana subproductos que como las tortas de oleaginosas, se destinan de modo prevalente a la alimentación animal, mientras que constituye una práctica común el uso de compuestos simples de nitrógeno como la urea, el biuret e incluso el sulfato amónico como fuente de proteína alimentaria para los rumiantes, (CUENCA y col., 1975; CUENCA, 1976)

Simultáneamente se están prodigando las investigaciones para la obtención de proteínas monocelulares a base de cultivos de algas, hongos y, sobre todo, bacterias así como la extracción de proteína de productos y subproductos vegetales no aprovechables directamente en la alimentación humana y animal.

1.2.- LAS PROTEINAS FOLIARES COMO FUENTE DE PROTEINA ALIMENTARIA

Los trabajos modernos de extracción de proteínas de las hojas empezaron con OSBORNE y WAKEMAN (1920) y CHIBNAL y SCHRYVER (1921) que utilizaron espinacas y repollo, respectivamente. Pero fué EREKY (1924) en Hungría, el primero en sugerir que podría extraerse la proteína de la hierba a gran escala, para utilizarla como alimento del hombre y de los animales no rumiantes. Con este fin puso a pun

to un método que obtuvo una patente industrial en 1927. SLADE(1937) llamó a la proteína foliar "queso de hierba" y GOODALL (1936) ensayó la extracción del jugo foliar utilizando una estrujadora industrial de las empleadas para la caña de azúcar. En la década de los 50 la primera máquina adecuada para la extracción protéica a gran escala fué desarrollada en Rothamsted (Gran Bretaña).

El tema ha sido ampliamente estudiado utilizando forrajes como materia prima. Porque se da la paradoja de que la substancia seca de la hierba, sobre todo en las primeras fases de desarrollo, antes de la floración, contiene una mayor proporción de proteína con valor biológico también mayor, que los granos de cereales; pero a causa de su gran riqueza en fibra, no puede ser utilizada como principal fuente de proteína por la mayoría de los animales; solo los rumiantes, para los que es indiferente la calidad de la proteína, tienen un aparato digestivo adaptado a la utilización de los forrajes verdes. Si se desea aprovechar la buena calidad de la proteína de los forrajes verdes para la alimentación de los monogástricos, es preciso previamente separar la fibra.

MORRISON y PIRIE (1961) y CHAYEN y col, (1961) descubrieron procesos mecánicos especiales para lograr la separación de la proteína y la fibra en los forrajes. Dicho proceso consiste en romper las paredes celulares con un molino de martillos modificado. Las proteínas solubles o en pequeñas partículas pasan a través de las membranas celulares rotas y se separan entonces de la celulosa y otras partes fibrosas de la planta por prensado o filtración de la pulpa verde.

Estos procesos, adquirieron especial relieve, desde que una de las siete secciones del Programa Biológico Internacional para la década 1964-74, la titulada "Uso y manejo de los Recursos Biológicos" prestó especial atención a la obtención de proteínas foliares. De hecho, en la referida Sección se recomendó realizar investigaciones sobre productos vegetales y animales no utilizables o de escasa utilidad que pudieran ser convertidos en sustancias alimenticias mediante biotécnicas.

El número de trabajos sobre proteínas foliares se incrementa desde entonces de modo vertiginoso y no es posible citarlos. Nos referiremos a algunos de los más sobresalientes.

Científicos del Laboratorio de Investigación Regional del Oeste, Albany (California) desarrollaron un método fácil para preparar un concentrado protéico de alfalfa. La técnica utilizada ha sido descrita por KOHLER y col, (1973). Los científicos de Albany denominaron al producto obtenido PRO-XAN (concentrado de proteínas-xantofilas). Las condiciones alcalinas por ellos utilizadas (pH 8 - 8,5) disminuyen la actividad protéasa y lipoxigenasa, evitando además, las pérdidas de magnesio de la clorofila. El sistema ha sido adaptado a escala comercial por la firma BATLEY-JANS-ENTERPRISES, situada en Brawley (California). Dicha firma producía en 1973, 4000 Tm al año de concentrado protéico, comercializado con el nombre de "X-PRO". El proceso de obtención ha sido descrito por BRAY (1973). Recientemente se ha realizado un estudio de los costos de equipamiento y fabricación así como del precio de los productos obtenidos por el procedimiento PRO-XAN para una planta de capacidad para procesar 40 Tm/hora de materia verde durante 180 días (6)

Además de PIRIE, en Inglaterra otros técnicos han patentado -- diversos procedimientos como el denominado BELT-PRESS, así como el VEPEX en Hungría por KOCK y col., mientras que en Italia GALOPINI y col, (1976) obtuvieron una patente de precipitación por polielectrolitos, etc.

En el presente, las máquinas para molar utilizadas en Gran -- Bretaña son capaces de procesar 5 Tm/hora. Las prensas de tornillo también están siendo mejoradas, aunque su capacidad de trabajo está por debajo de la de los molinos, siendo alrededor de 2 Tm/hora.

En la actualidad existen varias empresas que están fraccionando la alfalfa con fines comerciales. Entre ellas citaremos las siguientes:

- France-Lucerne (Francia) con una capacidad de tratamiento de 40 -- Tm de alfalfa verde/hora, por el procedimiento PRO-XAN.
- Unitritition de Bocm Siccol (Inglaterra) con una capacidad de 9 Tm/hora.
- Anhidro (Dinamarca) con una capacidad de tratamiento de 40 Tm/hora. Con la colaboración de VEPEX.
- En España Aproalfa con una capacidad de 15 Tm/hora.

Recientemente se establecieron las condiciones para una separación eficiente de las fracciones verde y blanca de proteína foliar a escala de laboratorio (DE FREMERY y col, 1973); el paso a planta piloto ha sido aportado por EDWARDS y col, (1975).

1.3.- LOS SUBPRODUCTOS VEGETALES COMO FUENTE DE PROTEINA ALIMENTARIA.

Como ya hemos visto, la tendencia del mercado nacional a la importación de productos agrarios, introduce un déficit crónico en nuestra balanza agraria y es un elemento desequilibrador de la balanza comercial, con su correspondiente incidencia en la Balanza de Pagos del país, punto de alto interés en el equilibrio económico.

Por tanto, resulta del mayor interés el aprovechamiento de los recursos nacionales en orden a conseguir una producción acorde con las tendencias del mercado, que resulte al menor coste posible.

El proceso de extracción de las proteínas foliares ha sido ya aplicado a numerosas especies entre las que podemos citar: Medicago sativa L., Phaseolus vulgaris L., Phaseolus trilobus Ait., Phaseolus aureus Linn., Trifolium pratense L., Trifolium subterraneum L., Trifolium repens L., Trifolium fragiferum L., Vicia sativa L., Vigna sinensis Savi., Dolichos uniflorus Lam., Pisum sativum L., Lupinus albus L., Cicer arietinum L., Trigonella foenum-graecum L., Arachis hypogaea, Vicia faba L., Melilotus alba Desr., entre las Papilionaceas. De la familia de las Gramíneas: Festuca pratensis - Hudson, Festuca arundinacea Schreber, Dactylis glomerata L., Lolium perenne L., Lolium multiflorum Lam., Zea mays L., Hordeum vulgare L., Avena sativa L., Triticum aestivum L., Phleum pratense L., Secale cereale L., Bromus arvensis L., Arrhenatherum elatius Mert y Koch. Entre las Crucíferas: Brassica oleracea L. var. botrytis, var. caulorapa y var. capitata, Brassica rapa L., Brassica napus L., Brassica nigra Koch., Sinapis alba L. y Raphanus sativus L. Entre las compuestas: Arctium tomentosum Miller, Carthamus tinctorius -

rius L., Cichorium intybus L., Cirsium oleraceum Scop., Helianthus annuus L. Entre las Quenopodiáceas: Beta vulgaris L., Atriplex hortensis L., Chenopodium album L., Chenopodium uribicum L., Spinacia oleracea L. De las Umbelíferas: Coriandrum sativum L., Daucus carotta var. sativa L., Pastinaca sativa L. De las Solanáceas: Solanum tuberosum L., Lycopersicon lycopersicum Karst. etc. etc. (7)

Dicho proceso tiene aún mayor interés económico si como materia prima se utilizan subproductos vegetales. Y así JOSHI (1971) estudió la extracción de proteínas de subproductos (hojas, tallos y cubiertas) de cacahuet (Arachis hypogaea, L.), garbanzo (Cicer arietinum, L.), zanahoria (Daucus carotta, L. var. sativa), remolacha - (Beta vulgaris, L.) y rábano (Raphanus sativus, L.). SINGH (1970) encontró que el valor nutritivo de la proteína de las hojas separadas para la preparación de Crucíferas como las coles (Brassica oleracea, L. var. capitata) y la coliflor (B. oleracea, L. var. botrytis) era aún mayor que el de la proteína de la alfalfa. PIRIE (1971) propone las peladuras de patatas, donde se concentra la mayor parte de la proteína del tubérculo, etc. etc.

En nuestro país una de las posibilidades que ofrece perspectivas más brillantes y racionales es la de aprovechar los subproductos de la industria de conservas vegetales por estar concentrada en zonas bien definidas y por su volumen de producción. La importancia de revalorizar estos subproductos ha sido ya puesta de manifiesto - por diversos autores, sobre todo los del área Sureste con referencia a la alimentación animal (8).

Uno de estos subproductos está constituido por las partes que quedan de la planta de guisante una vez separados los granos que se

conservan para uso en la alimentación humana.

1.4.- EL GUISANTE (*Pisum sativum*, L.) COMO FUENTE DE PROTEINA.

El guisante cultivado pertenece a la especie *Pisum sativum* L. Es una planta anual, trepadora, glabra y glauca, de tallos cilíndricos delgados que llegan a alcanzar 30-180 cm. de altura. Hojas con 2 a 3 pares de folíolos ovoides, terminadas en un zarcillo ramificado. Estípulas muy grandes, semejantes a los folíolos, dentadas en la parte más baja. Flores agrupadas en racimos axilares (2 a 4 flores cada racimo), ligeramente pedunculados. Cáliz con dientes anchos; corola blanca o rojo púrpura; estandarte ancho, erguido; estambres diadelfos, tubo estamínifero corto, transversalmente truncado. Legumbres lisas, casi cilíndricas, con numerosas semillas (2-10) que varían en color y tamaño según los tipos y variedades. Es una planta endógama y de germinación hipogea.

Probablemente es originario del S.O. de Asia. Se cultiva desde los tiempos prehistóricos, pero el origen de su cultivo se desconoce.

Desde el punto de vista de sus cualidades alimenticias pueden considerarse tres grupos (PEREZ y col. 1979):

- De mesa (*Pisum sativum* L.): destinados a alimentación humana, generalmente para conservas. Se aprovecha el grano únicamente.

- Forrajeros (*Pisum arvense*): Se utiliza la planta entera para alimentación animal.

- "Proteínicos" obtenidos por selección, son tipos varietales

de Pisum sativum: destinados a alimentación animal, pero de elevado contenido en proteína y gran rendimiento en grano seco.

Respecto a la extensión y evolución de su cultivo los datos recogidos nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1º) A escala nacional, el total de la superficie destinada al cultivo del guisante, en el periodo estudiado 1966-79 muestra una tendencia decreciente, con oscilaciones que destacaremos al tratarla al nivel provincial. Como es de esperar, estos decrecimientos se manifiestan en el cultivo en secano, mientras que en regadío se mantiene, con fluctuaciones anuales. En los primeros años estudiados, 1966-71, (ver tabla 4), la superficie de regadío suponía el 45 % -- del total destinado al cultivo del guisante, mientras que de 1973-76 fué de aproximadamente el 55 % y en 1977, el 60 %.

2º) A escala provincial, Se localizan dos zonas fundamentales: el Levante, en el amplio sentido, de Almería a Barcelona con representación en la costa sur Mediterránea y la zona Riojana dada por los cultivos de Logroño y Navarre. También tiene importancia -- una provincia aislada: Toledo.

La evolución de la superficie destinada al cultivo del guisante en la zona que hemos llamado Levantina, ha seguido una pauta creciente hasta 1971, pasando de 7735 ha (sin sumar la de Murcia, -- por carencia de datos) en la campaña 1966-67, a 11.331 ha en 1971. En 1972 se produjo un descenso muy brusco en la superficie destinada a dicho cultivo en esta amplia zona, 7778 ha, para volver a -- aumentar en 1973 hasta 10.381 ha. Dada la importancia de esta zona en el cultivo de la citada leguminosa, estas oscilaciones descri--

tas quedan ampliamente reflejadas en el total nacional. A partir de este año y hasta 1979, la evolución ha sido claramente decreciente, quedando reducida a 3.530 ha en este último año.

En la zona que denominamos riojana, la evolución parece haber sido muy distinta. Mientras en las cinco primeras campañas consideradas la superficie destinada a dicho cultivo osciló entre las 450 ha de la campaña 1966-67 a las 734 de la de 1970-71, pertenecientes en su mayoría a la provincia de Logroño. A partir de esta fecha, el cultivo alcanza una importancia notoria en Navarra y se mantiene -- con fluctuaciones, en Logroño. Debido a ello, la superficie cultiva da de guisantes alcanzó, en la campaña 1971-72, 1.350 ha en la ci ta da zona y llegó a un máximo de 1.950 ha en 1978.

En Toledo, la tendencia también ha sido decreciente, pasando de las 2.100 ha de la primera campaña estudiada a las 650 de 1979, aunque con oscilaciones muy grandes en años intermedios.

Los rendimientos, en condiciones análogas a las señaladas para la superficie, tanto en secano, como en regadío, se muestran bastante constantes a largo plazo (salvo los cuatro primeros años, que muestran unos rendimientos muy elevados en secano), con fluctuaciones anuales. Ello puede deberse al escaso empleo de capital por la empresa, lo que hace que el medio haga sentir su peso.

Destaca por los elevados rendimientos, tanto en secano como -- en regadío, la provincia de Castellón, siendo dicha provincia la -- principal productora de guisantes. Hay que señalar, no obstante que en los últimos años tanto la superficie dedicada a este cultivo como los rendimientos han disminuido notoriamente en dicha provincia.

Los rendimientos en secano oscilan, considerando las medias de los 14 años estudiados, entre los 13,25 Qm/ha de Murcia y los 58,75 de

Tabla No 4.- GUISANTES VERDES: ANALISIS DE LA SUPERFICIE, RENDIMIENTO, PRODUCCION, VALOR

Y COMERCIO EXTERIOR.

Año o Campaña	Superficie		Rendimiento		Producción Tm	Valor en millones ptas.	Comercio exterior	
	Secano ha	Regadío ha	Secano Qm/ha	Regadío Qm/ha			Importa- ciones Tm	Exporta- ciones Tm
1966	7.374	6.051	13.425	63,6	83.786,3	963	229	3.001
1967	7.660	6.497	14.157	57,7	84.136,8	1.013	15	3.172
1968	8.466	7.061	15.527	67,4	104.128,1	1.436	15	3.011
1969	8.166	6.322	14.488	70,0	96.030	1.518	22	2.997
1970	8.880	7.353	16.233	26,5	62.239,7	847	4	3.736
1971	7.900	7.700	15.600	23,38	60.563,6	934	58	4.404
1972	4.791	7.221	12.012	26,52	51.439,5	843	67	5.885
1973	7.168	8.808	15.976	23,5	63.526,3	1.060	5	4.263
1974	7.077	8.166	15.243	24,84	62.962	1.097	1	4.096
1975	6.233	7.778	14.011	29,30	61.669	1.433	20	4.357
1976	5.500	7.126	12.626	25,86	56.048	1.920	-	4.407
1977	4.521	6.818	11.339	26,17	52.205	1.674	-	2.502
1978	4.289	7.227	11.516	27,72	55.198	-	1	3.484
1979	-	-	11.144	-	46.800	-	-	-

FUENTE: Anuario Estadístico de la Producción Agraria.

Castellón. En regadío los menores rendimientos son los de Badajoz y Zaragoza (40 Qm/ha) y los mayores, también los de Castellón, con una media de 126,25 Qm/ha.

La producción total española muestra una tendencia creciente en el periodo 1966-68, pasando de 83.786 Tm en la campaña de 1966-67 a 104.357 en la de 1968-69, con un máximo en este último año, - produciéndose en los dos años siguientes un descenso muy pronunciado, con 62.239,7 Tm en la campaña 1970-71, seguido de un descenso lento en los dos años posteriores para aumentar de nuevo en 1973 - en que se sobrepasaron las 63.526 Tm. A partir de este año y hasta la actualidad, se ha mantenido una tendencia ligeramente decreciente y para 1979 los Avances de Estadística Agraria cifran la producción en 46.800 Tm.

La zona levantina, comprendiendo las provincias de: Almería, Murcia, Alicante, Valencia, Castellón de la Plana, Valencia, Tarragona y Barcelona, en el periodo estudiado produjo un 69 %, como media, del total nacional, siendo Castellón la provincia que contribuye con mayor producción, suponiendo por sí sola el 32,75 % del total nacional. La zona riojana, produjo como media, el 8,5 % del total, y la provincia de Toledo 8,0 % durante los catorce años - estudiados.

La evolución de la producción de guisantes en estas zonas, a lo largo del periodo de tiempo citado ha sido la siguiente:

- En Levante fué creciente durante las tres primeras campañas, para disminuir a partir de la tercera (1968-69) hasta la actualidad. La contribución de esta zona a la producción nacional fué

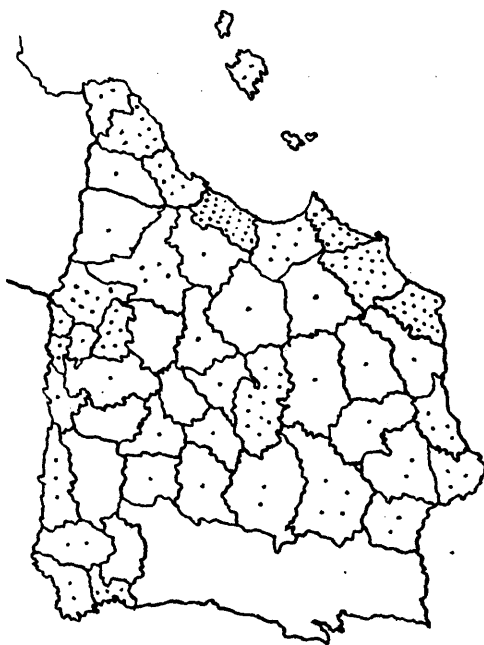


Figura 1.- DISTRIBUCION POR PROVINCIAS DE LA SUPERFICIE DEDICADA AL CULTIVO DEL
GUISANTE.

Promedio de los años 1966-1979.

Un punto = 100 has. o fracción de 100 has.

del 70-72 % durante las cuatro primeras campañas, para disminuir, a partir de esta fecha, hasta el 43 % en el año 1979.

- Este descenso de producción que es consecuencia de la disminución de la superficie dedicada al cultivo, es paliado en parte, por un aumento de ambos en la zona riojana, pasando de las aproximadamente 2.500 Tm que se obtenían en las cuatro primeras campañas a las 7.500-8.500 de los últimos cinco años, habiéndose producido el mayor salto en la campaña 1971-72, debido al gran aumento de la superficie de este cultivo en la provincia de Navarra, como ya hemos señalado.

- Toledo que al inicio de este periodo, en 1966-67 produjo 10.300 Tm. disminuyó notablemente su producción en 1970-71, en que fueron recolectadas solo 5.000 Tm para, después de grandes fluctuaciones anuales, en los dos últimos años haber alcanzado solo 1.500 y 1.300 Tm, respectivamente.

La contribución relativa de la Rioja, a la producción total ha ido creciendo a lo largo de todo el periodo estudiado, desde el 2,5-3 % al comienzo, hasta sobrepasar el 16 % en el último año.

La de Toledo, como consecuencia de lo expuesto antes, ha seguido el camino contrario, pasando del 12,25 % en la primera campaña al 2,75 % del último año, aunque se observan fluctuaciones anuales importantes en el periodo central.

Si bien no poseemos datos de las Industrias Conserveras Vegetales, el volumen anual de subproducto de guisante ha sido calculado en 12.994,5 Tm para nuestro país, según SANCHEZ-VIZCAINO y col. (1971) y contiene un 16,48 % de proteína bruta sobre materia seca,

Tabla nº. 5.- COMPOSICION DE GRANOS DE LEGUMINOSAS ESPANOLAS

Los aminoácidos en % de la proteína bruta (N x 6,25)

Aminoácidos esenciales de algunas razas.	Algarroba	Almorta	Altramuz amargo	Garbanzo	Guisantes	Habas	Alubias blancas	Lentejas	Veza	Yeros
Lisina	6,12	9,65	6,12	7,62	5,46	5,86	5,76	7,60	5,32	9,80
Metionina+cistina	1,21	0,59	1,03	0,84	1,93	1,28	1,44	1,14	0,87	1,81
Treonina	2,33	3,82	3,61	3,79	4,08	5,13	4,42	3,36	5,77	2,12
Isoleucina	1,20	1,20	3,79	3,00	3,92	4,93	4,14	3,74	3,67	7,21
Leucina	6,26	6,42	7,50	8,06	6,58	19,26	8,21	7,53	7,52	8,45
Valina	2,86	5,88	4,03	5,44	4,54	3,30	6,19	4,24	1,82	8,84
Fenilalanina+tirosina	3,99	4,39	6,75	7,06	5,74	8,20	3,06	7,32	3,88	6,90
Histidina	2,17	2,70	2,18	2,51	1,54	1,60	1,40	3,29	1,28	1,64
Arginina	6,30	3,29	7,14	6,10	5,46	6,10	4,81	4,31	5,31	4,22
Energía metabolizable (kcal/kg)	1,680	2,200	2,100	2,240	2,200	2,330	1,320	1,750	2,370	2,290
Proteína bruta, %	21,12	25,65	27,00	21,37	21,00	24,85	19,13	20,84	20,03	20,65

según los mismos autores.

El guisante (Pisum sativum, L.) se puede considerar, pues, como una de las principales leguminosas de grano que se cultivan en nuestro país (tabla 4). La semilla (grano) constituye una fuente de proteína para la alimentación humana muy importante, con una composición que, a semejanza de otras leguminosas, resulta deficiente en metionina (tabla 5), pero que, a diferencia de ellas, no posee apenas factores antinutritivos. Finalmente, en el proceso de conservación del grano que realiza la industria correspondiente, se obtiene un subproducto: la planta desgranada, que se emplea como abono o se aprovecha de modo directo o previo ensilado por los animales domésticos. Esta utilización, puede, ciertamente mejorarse, pero una alternativa muy importante, a la vista de lo dicho, sería la derivación hacia la alimentación humana -mediante la previa extracción- de la proteína que dicho residuo contiene, sin restar valor nutritivo para los rumiantes, como luego veremos.

Consiguientemente, y dado que no se poseen datos al respecto, dentro de un plan general de investigación desarrollado por la Cátedra de Agricultura y Economía Agraria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense y el Inst^o. de Alimentación y Productividad Animal, C.S.I.C. (Madrid) sobre "Obtención de concentrados proteícos a partir de subproductos de la Industria Conservera Hortofrutícola", en este trabajo hemos abordado el estudio de la extracción y caracterización de la proteína del subproducto del guisante, -constituido por la parte aérea de la planta desprovista del grano- con

vistas a su utilización en la alimentación humana o animal.

Para ello hemos estudiado los siguientes aspectos:

- a) Proceso y rendimiento de los productos obtenidos en las diferentes etapas del fraccionamiento.
- b) Composición químico-bromatológica de los principales productos: CPF y residuo fibroso.
- c) Valoración nutritiva del concentrado proteínico y del residuo.

Hemos de señalar, finalmente, en esta introducción, que las aportaciones originales sobre los diversos aspectos abordados en este trabajo de investigación, con el que optamos al grado de doctor en Ciencias Biológicas, son imprescindibles para sentar sobre bases racionales la posible aplicación a este tipo de subproducto de la avanzada tecnología de extracción de proteínas existente. La importancia económica y social del proceso pueden ser muy grandes, pero son aspectos que no tocamos porque son ajenos a nuestra formación biológica.

-
- (1) La proyección del incremento de la población mundial desde 1970 a 1985 se calcula en un 35 % (5.000 millones de habitantes), - mientras que los incrementos de población proyectados al año - 2000 a partir de las variantes baja, media y alta son 64 %, 78 % y 95 % sobre 1970.
 - (2) Si bien a escala mundial las proyecciones para 1985 indican -- que la producción total de alimentos vegetales y animales para el hombre se equilibrará razonablemente bien con la demanda -- bruta, con las excepciones de las semillas oleaginosas, carne de bovino, cordero-carnero, leche y pescado (déficit del 24 %, 7,3 %, 11,4 %, 6,8 % y 5 % respectivamente), las deficiencias - proyectadas en algunas regiones son mucho más críticas. Así en Asia, América Latina y África se señalan deficiencias mayores en productos animales, trigo, granos pansen y semillas oleaginosas.

- (3) El establecimiento de las exigencias nutritivas del hombre no es tarea fácil. Las recomendaciones cambian con el tiempo a medida que se dispone de nuevas pruebas. Por ejemplo, las recomendaciones diarias para la proteína han sido revisadas haciéndolas disminuir en un 20 % durante la última década.

Las exigencias de proteína de huevo o de leche se cifran en 29 g por cabeza y día. Sin embargo, esta cifra carece de significación en gran medida, porque cualquier población obtiene su suministro protéico a partir de una mezcla de cereales, leguminosas y productos animales obtenidos localmente. Se admite que la mezcla de tales proteínas tiene un valor medio del 60 % de la proteína de la leche o de los huevos. Los datos que se citan por diversos organismos y autores son variables y ninguno de ellos tiene un valor absoluto.

- (4) Los valores energéticos (Kcal kg⁻¹) son aquí los utilizados en la alimentación humana, aunque casi todo lo importado se destina a la alimentación animal.
- (5) Tomamos la Gigacaloría como unidad porque viene a equivaler a las exigencias anuales de la población por cabeza si se descuentan un 10 por 100 por pérdidas durante el transporte y preparación del alimento para el consumo (1 Gcal = 1.10⁶ Kcal, menos el 10 por 100, 900.000 Kcal/365 días = 2.465 Kcal); es pues, una magnitud que facilita los cálculos a escala mundial o nacional, GONZALEZ (1974).
- (6) Feedstuffs, Enero 1979, 22-39-40.
- (7) Hemos seleccionado las especies más conocidas de nuestras latitudes pertenecientes a familias muy estudiadas en los procesos de extracción de la proteína foliar. La mayoría de ellas fueron ya citadas por PIRIE (1971).
- (8) Entre ellos, SANCHEZ-VIZCAINO y col, (1971). Estos autores señalan que la cantidad anual de residuos en materia seca de alcachofa, guisante, tomate y naranja, alcanza las 53.600, 12.994, 1971, y 71.000 Tm, respectivamente, con cantidades de proteína bruta que oscilan entre el 13 y el 20 % para los tres primeros productos y de 7 % para el último.

24

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.- MATERIAL

Bajo este epígrafe se incluye la descripción de las características agronómicas de la variedad de Pisum sativum, L. empleada, así como las de la parcela en que se obtuvieron las plantas, condiciones de cultivo, recolección y controles de rendimiento.

2.1.1.- Variedad de guisantes utilizada.

Se empleó la "Dark Skin Perfection". Es una variedad muy -- apreciada por la Industria conservera tanto por su rendimiento -- agrícola como por su aptitud para la industrialización, por lo que su cultivo está extendido en las zonas de producción del guisante y además es una variedad adecuada a las condiciones climáticas del lugar de ensayo.

Las características más conocidas de dicha variedad son:

- Procedencia: Asgrow.
- Precocidad: Media
- Porte de la planta: 0,60 - 0,65 m.
- Tipo de semilla: rugosa, de color verde oscuro cuando está -- seca.
- Peso de 1.000 semillas: 240 g.
- Número de granos/vaina: 8 - 8,5.
- Longitud media de la vaina: 8 - 10 cm.
- Grados día: 800
- Rendimientos kg grano/ha: 4.800.
- Grado tenderométrico: 110.
- Diámetro: (porcentaje de granos menores de 8,5 mm) finos: 12
(porcentaje de granos mayores de 8,5 mm) gruesos: 88.
- Aptitud conservera: enlatado y congelado.

2.1.2.- Parcela experimental.

Se utilizó una parcela de 1.419 m^2 de superficie, ubicada en los terrenos experimentales que dispone la Cátedra de Agricultura de la Facultad de Veterinaria de Madrid, sitos en Puerta de Hierro.

De acuerdo con los análisis de fertilidad se trata de un suelo de textura franco-arcillo-arenosa, $\text{pH} = 7,50$ (H_2O) y $6,80$ (ClK), pobre en materia orgánica ($1,91 \%$), con una relación $\text{C/N} = 9,4$, -- con mucho fósforo asimilable (4.860 kg/ha de P_2O_5), y deficiente -- en potasio (510 kg/ha de K_2O) y nitrógeno ($0,117$ por 100) asimilables.

2.1.3.- Preparación del terreno, siembra y tratamientos posteriores.

La parcela experimental fué elzada con arado de vertedera en octubre de 1976. Se dió una labor de rotovator unos días antes de la siembra, e inmediatamente fué abonada a razón de las siguientes dosis: 25 kg/ha de N ; 75 kg/ha de P_2O_5 y 100 kg/ha de K_2O . El nitrógeno fué aplicado en forma de nitrato amónico-cálcico (26%). El fósforo en forma de superfosfato (18%) y el potasio en forma de sulfato potásico (50%). Una vez esparcido el abono se dió un nuevo pase de rotovator y se procedió al marcaje de las líneas para la siembra.

La siembra fué efectuada el 16 de marzo de 1977. La separación entre líneas fué de 60 cm y la dosis de semilla utilizada 130 kg/ha . La semilla se enterró con rastrillo.

En mayo se efectuó una escarda a mano debido a la gran invasión de malas hierbas.

2.1.4.- Recolección y toma de muestras.

La madurez de los guisantes para su recolección se determinó por su contenido en sólidos insolubles en alcohol, de acuerdo con el método descrito por la AOAC (1965). La recolección se hizo cuando las muestras analizadas dieron un porcentaje de sólidos insolubles en alcohol de 15,31 (promedio). Por tanto tenían buena calidad para conserva puesto que dicho índice estaba comprendido en el intervalo 11-17 % recomendado.

La toma de muestras se hizo de la siguiente manera: se fijó una de las variables tomando los 13 m lineales del centro de cada línea y se eligieron 12 líneas por sorteo de entre las 73 de la parcela, después de exceptuar las 5 que resultaron elegidas para el registro de rendimientos.

La cosecha fué recolectada los días 27-28 de junio de 1977 y se almacenó en sacos de malla de aproximadamente 4 kg de peso en cámara frigorífica a -15°C, para evitar alteraciones significativas.

2.1.5.- Control de rendimientos y relación legumbre/resto planta y grano/vaina.

Para determinar los rendimientos de la cosecha en materia verde, materia seca y proporciones legumbre/resto planta (parte aérea) y grano/vaina, se tomaron cinco muestras de 5 m lineales cada una que fueron recolectadas en los 5 m centrales de las cinco líneas seleccionadas por sorteo.

Una vez recolectadas, las muestras se introdujeron en sacos de malla previamente tarados y numerados y se pesaron para determi

nar los rendimientos en materia verde/ha.

Una parte, de unos 500 g de materia verde, fué tomada al azar de cada uno de los sacos y desecada inmediatamente en una estufa Heraeus de aire forzado a 100°C durante 24 horas, para determinar la humedad y los rendimientos de la cosecha total.

Otra cantidad, también tomada al azar, de 500-600 g, de cada uno de los sacos, fué separada para determinar la proporción - legumbre/resto parte aérea de la planta y grano/vaina. Para ello, se separaron manualmente las legumbres, pesando por separado cada una de las fracciones de las distintas repeticiones, a continuación se separaron los granos de las vainas, pasándose ambas fracciones por separado. Debidamente numeradas, las tres fracciones - obtenidas: resto planta, grano y vaina, se desecaron en estufa en las mismas condiciones que hemos descrito anteriormente.

Todos estos controles fueron llevados a cabo para poder referir los datos a materia seca y determinar, en los casos que interesen, los rendimientos

2.2.- MÉTODOS

2.2.1.- La extracción de la proteína. Fundamentos

Las etapas básicas en la preparación de concentrados proteícos vegetales son:

- 1.- Moler el material vegetal hasta la ruptura de las células.
- 2.- Prensar para separar el zumo de la fibra.
- 3.- El zumo que contiene proteínas solubles y cloroplastos suspendidos (KÖHLER y GRAHAM, 1951) puede ser concentrado y/o secado -

sin mayor separación (HARTMAN y col. 1967).

4.- Alternativamente pueden separarse del zumo un coágulo verde de proteína (LPC leaf protein concentrate) y una solución coloreada de marrón claro (solubles), después de haber tratado el zumo con calor, ácidos, disolventes, etc.

2.2.1.1.- Ruptura celular.

Para que la extracción del zumo sea llevada a cabo de una manera eficiente debe ir precedida de un proceso de ruptura celular. Como ya señalaron OSBORNE y WAKEMAN (1920) es virtualmente imposible romper el 100 % de las células. En estudios de laboratorio con hojas de muy poca fibra como la espinaca (LUGG, 1939) y el tabaco (CROOK, 1946) consiguieron valores elevados de 90-95 %. Bajo condiciones prácticas, a gran escala, parece probable alcanzar el 75 % de ruptura, EMETARON (1976) propuso y desarrolló un procedimiento para obtener un índice de ruptura celular.

Es muy deseable alcanzar un porcentaje adecuado de ruptura evitando que el residuo quede demasiado finamente dividido, lo que haría disminuir la permeabilidad y por tanto la velocidad con que va saliendo el zumo y, además, podría afectar adversamente al proceso digestivo de los rumiantes, cuando dicho residuo es utilizado como única fuente de forraje (KOEGL y col. 1977).

2.2.1.2.- Prensado: separación del extracto y la fibra.

DAVYS y PIRIE (1969) diseñaron una unidad para moler y otra para prensar para el International Biological Program, utilizable en ensayos de laboratorio para 4 ó 5 kg de muestra. (DAVYS, PIRIE y STREET, 1969). Hay diferentes opiniones sobre el diseño de unida

des a gran escala, como por ejemplo la descrita por PIRIE en "Leaf Protein" (IBP Handbook nº 20).

Para la producción comercial en USA, se utilizan prensas de rodillos, similares a las empleadas para la caña de azúcar.

Nosotros utilizamos el método descrito por NANDA (1975), -- con las modificaciones imprescindibles para adaptarlo a nuestras -- posibilidades materiales. Elegimos este método fundamentalmente -- por dos razones: a) el elevado rendimiento que se obtiene, b) la -- necesidad de añadir agua pues el material de que partimos es muy -- rico en materia seca. (Figura 2).

A las plantas de guisantes recolectadas y conservadas en la cámara se les separó manualmente el grano. A continuación la mata se trituró en un molino Minipulper ML 1 A, determinándose la materia seca y el nitrógeno de este material triturado, para conocer -- las proporciones que se podían extraer.

En los ensayos de determinación del pH más idóneo a que debe ser sometida la solución extractante, se parte de 1 kg de esta material triturado, que se mezcla con agua hasta conseguir una dilución de 90 g de materia seca/kg de solución. Después se ajustó -- el pH a los valores 4,5, natural, 7,0, 9,0 y 11,0, utilizando ClH 1,1 N ó NaOH 1 N, según los casos y dejando reposar 15 min. La parte sólida (residuo fibroso, pulpa, cosecha prensada) se separó entonces de la mezcla exprimiendo a través de un lienzo recogándose el zumo con las proteínas solubilizadas.

Se repitió el procedimiento de extracción sin volver a triturar (adición de agua, ajuste de pH y prensado) del residuo fibro

so procedente de la primera extracción. Se pesó el líquido obtenido en cada una de las dos extracciones y se analizó el nitrógeno total en ambos.

En los demás fraccionamientos realizados, que son objeto de este estudio, se operó de forma análoga a la descrita anteriormente, excepto en lo siguiente: Se partió de 10 kg de material triturado inicial. La solución solubilizante se dejó reposar durante 15 minutos a pH natural (5,7-5,9).

2.2.1.3.- Separación de la proteína del extracto. Coagulación.

Las proteínas foliares coagulan fácilmente. Se pueden utilizar diversos métodos: a) Envejecimiento durante 1 ó 2 días, b) Acidificación, c) Calor, etc.

La coagulación por medio de calor ha sido propugnada por muchos autores. Sus ventajas son que el coágulo es más fácilmente filtrable, se disminuye la contaminación microbiana y se inactivan algunas enzimas, PIRIE (1971). Otros, como SUBBA RAU y SINGH (1970) observaron crecimientos más rápidos en ratas alimentadas con proteínas obtenidas por coagulación por calor que en otras a las que se había dado proteínas obtenidas por coagulación ácida.

Para que el coágulo sea fácilmente filtrable el calentamiento debe ser rápido, así además se reduce la acción enzimática antes de su inactivación. Las plantas ricas en clorofila, como la alfalfa, y el trigo, muestran la importancia de esto; así la clorofila en los CPE obtenidos por calentamiento lento hasta 80°C es casi completamente hidrolizada a cloroflida, mientras hay poca hidrólisis con calentamiento rápido a 100°C (ARKCOLL y HOLDEN, 1973). Si

METODO DE EXTRACCION DE LA PROTEINA

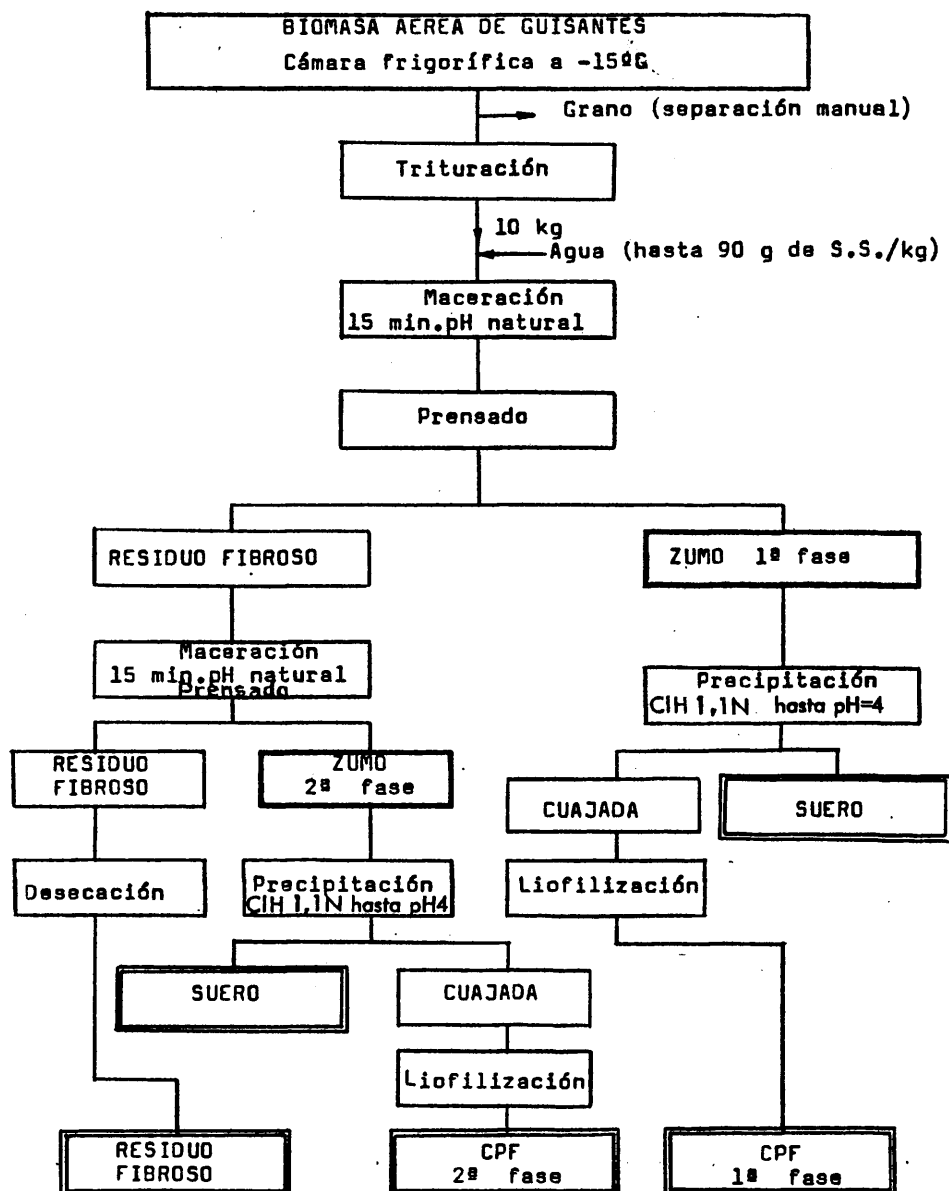


Figura 2.

la proteína obtenida por calentamiento lento es lavada en condiciones débilmente ácidas se forma feofórbido, por pérdida de magnesio. Los CPF obtenidos por calentamiento lento de jugo de alfalfa (HOVE y col. 1973) contienen suficiente feofórbido para fotobansibilizar ratas alimentadas con él (LOHREY y col. 1974).

Otros autores, entre ellos NANDA y col. (1975) utilizan la coagulación por medio de la adición de ácido. BYERS (1971) señala que los CPF obtenidos por coagulación ácida son más ricos en lisina que los obtenidos por coagulación por calor. Así mismo la coagulación por calor disminuye la disponibilidad de la metionina y la lisina, como se verá más adelante.

Se han comprobado otros métodos de precipitación (WOLDEGIORGIS, 1976) como la fermentación anaerobia y la precipitación isoelectrica, mostrándose más ventajosos que el calor, con respecto al contenido en aminoácidos azufrados.

Nosotros, siguiendo con el método ya citado de NANDA (1975) hemos empleado la precipitación ácida. Los zumos obtenidos se reajustan a pH 4 para precipitación de las proteínas utilizando ClH - 1,1 N. Las proteínas precipitadas se separan por filtración a través de una tela de percal. El concentrado protéico se liofilizó y se reservó para posteriores análisis. Lo mismo se hizo con parte del zumo en cada extracción.

El residuo fibroso restante se desecó en estufa a aproximadamente 100°C. También se liofilizó una muestra de material triturado inicial, para poder referir en cada caso, los resultados analíticos al material de partida. Después todos estos productos se -

molieron y reservaron para posteriores análisis, guardándose en frascos topacio de tapón esmerilado.

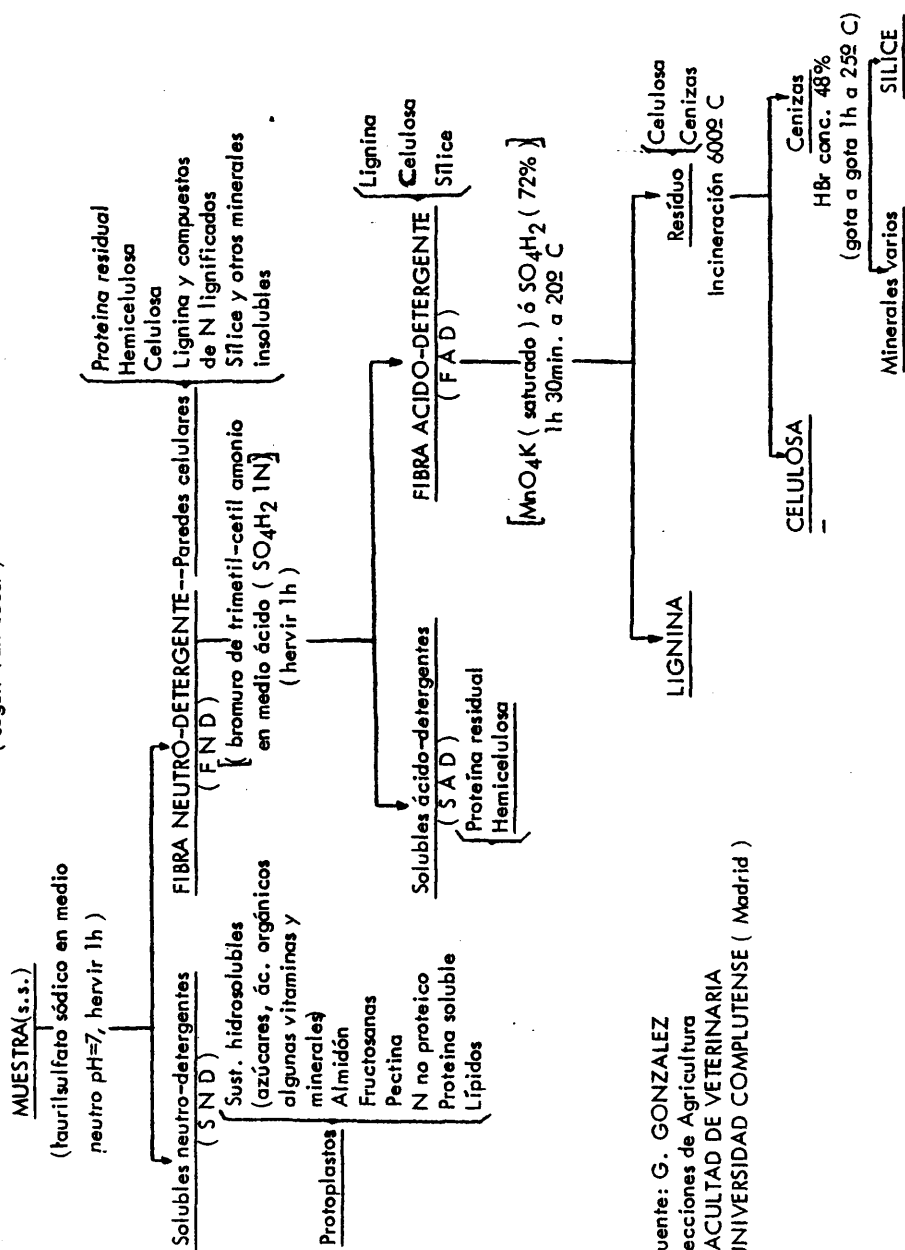
2.2.2.- Análisis químico-bromatológicos.

Para el análisis químico-bromatológico se siguieron las técnicas incluidas en los dos métodos de laboratorio que tradicionalmente se utilizan como base para la valoración de los alimentos del ganado: el método WEENDEE (GONZALEZ, 1964), y muy en especial el método de VAN SOEST (VAN SOEST y WINE, 1967) (Fig. 3).

Efectivamente, la principal objeción que suele oponerse a la técnica de WEENDEE es la poca clara definición de la naturaleza de la fracción que resulta del análisis de fibra bruta (F.B.). Dicha fibra bruta comprende la celulosa y aquellas porciones de hemicelulosa y lignina no solubles en las extracciones ácida y alcalina -- usadas para aislarla. Parte de la hemicelulosa y de la lignina se disuelven por estos procedimientos y como consecuencia son estimados como componentes no fibrosos, por lo tanto, la fibra bruta desestima el contenido verdadero de las paredes celulares.

La definición de paredes celulares (P.C.) como el residuo que queda después de la extracción con una solución neutro-detergente, desarrollado por VAN SOEST y WINE (1967), aísla perfectamente esta fracción, permite después separar cuantitativamente sus constituyentes y obtener por diferencia los protoplastos (100-PC). Esta partición en paredes celulares y protoplastos tiene numerosas ventajas teóricas y prácticas. Los componentes protoplásticos son casi el 100 % digestibles y solamente aparecen en las heces como resultado de las fermentaciones microbianas y de las pérdidas metabólicas de tejidos y de jugos digestivos en el intestino. Por el contrario, la digestibilidad de la fracción paredes celulares es va-

Figura 3. - PARTICION DE LA SUSTANCIA SECA VEGETAL
(según Van Soest)



Fuente: G. GONZALEZ
Lecciones de Agricultura
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE (Madrid)

riable, dependiendo de su grado de lignificación, del nivel de alimentación, forma física y algunos otros componentes de la ración.

En consecuencia, además de la humedad, se realizaron las siguientes determinaciones en la sustancia seca: extracto etéreo (partición WEENDEE), fibra neutro-detergente, fibra ácido-detergente, lignina-permanganato, celulosa-permanganato y hemicelulosa (partición VAN SOEST) y cenizas brutas (partición WEENDEE).

2.2.2.1.- Humedad.

Determinada por desecación en estufa a una temperatura de - - 105°C hasta peso constante (A.O.A.C., 1965).

2.2.2.2.- Análisis de N total.

Se empleó el método de la AOAC (1965), añadiendo al sulfúrico de ataque, ácido salicílico en la proporción 1 l/50 g, respectivamente. Pasada media hora se añade 1 g de zinc en polvo/g de muestra y a los 5 min. el catalizador. Se utilizaron pastillas Kjeldahl ("Catalyst tablets", laboratorios BDH), 2 pastillas/g de muestra. Cada pastilla contiene 1 g de SO_4Na_2 y el equivalente de 0,1 g de Hg. El mercurio parece ser el catalizador más efectivo. Para prevenir las pérdidas de amoníaco que pudiera ser arrastrado por el óxido de mercurio al añadir el álcali previo a la destilación, se añadió tiosulfato sódico, que precipita el mercurio como sulfito mercúrico negro. En la titulación se utilizó como indicador el SHIRO-TSCHIRO.

2.2.2.3.- Nitrógeno no-protéico.

Se ha analizado por el método de GOSWAMI and WILLCOX (1969) que considera nitrógeno no protéico a la suma del nitrógeno total - en extracto con alcohol a 80 % más el nitrógeno de péptidos.

Extracción con alcohol al 80 %: 10 g de muestra molida son extractados 4-5 veces con un volumen total de 300 ml de etanol al

80 %. Después de mezclar las distintas extracciones, se reduce el volumen de líquido en un rotovapor a 40°C al vacío. Se filtra el extracto residual y se completa hasta 50 ml, añadiendo unas gotas de cloroformo y almacenando en nevera. Se determina el nitrógeno total por el método de Kjeldahl, utilizando ácido sulfúrico y tío sulfato.

Nitrógeno de péptidos: El residuo obtenido después de la extracción con alcohol al 80 %, es extractado nuevamente 3-4 veces con agua destilada a 0°C y con pH de $5,0 \pm 0,1$. Se unieron los extractos y se evaporaron en rotovapor a 60°C al vacío. Se filtró y se completó el volumen hasta 50 ml, añadiendo unas gotas de cloroformo y manteniendo en nevera. Se determinó el nitrógeno total como en el caso anterior.

2.2.2.4.- Extracto etéreo.

La muestra se introduce en un cartucho de extracción exento de materias grasas. Se utiliza la extracción en Soxhlet y como disolvente el éter etílico. El extracto etéreo se recoge en un recipiente seco, previamente tarado. Una vez transcurrido el tiempo de extracción se elimina el éter por destilación y se seca enseguida el residuo de evaporación durante hora y media en el vacío (20 - - Torr) a la temperatura de 75°C. Se enfrió en un desecador y se pesó (Método A.O.A.C., 1965).

2.2.2.5.- Fibra neutro-detergente (FND).

Se utilizó la técnica de GOERING y VAN SOEST (1970). Se colocó 1 g de muestra en un vaso de Berzelius y se añadieron 100 ml de solución neutro-detergente, 2 ml de decalina y 0,5 g de sulfito

sódico. Se calentó y se mantuvo a ebullición 60 minutos pasados - los cuales, se filtró a través de un crisol de vidrio previamente tarado, utilizando poco vacío, que se aumenta en caso necesario. Se lavó el vaso con agua caliente y el producto del lavado se fué echando en el filtro, después se lavó el vaso dos veces con acetone. Se desecó el crisol a 100°C en estufa durante 8 horas, tras lo cual se dejó enfriar en un desecador con pentóxido de fósforo.

Una vez frío se pesó y la diferencia entre esta pesada y la tara del crisol es la fibra neutrodetergente, que según Van Soest, es equivalente a las paredes celulares.

2.2.2.6.- Fibra ácido-detergente (FAD).

También según método de GOERING y VAN SOEST (1970) se pasó 1 g de muestra que se echó en un vaso de Berzelius, se añadieron - 100 ml de solución ácido-detergente y 2 ml de decalina. Se colocó encima del vaso un tamiz refrigerante. Se calentó hasta que hirvió y se mantuvo en ebullición durante 60 minutos. Transcurrido este - tiempo se filtró a través de crisoles de vidrio previamente tara-- dos, utilizando el menor vacío posible, lavando el vaso primero -- con agua destilada a 90-100°C y después dos veces con acetona. Se desecó en estufa a 100°C y se enfrió en un desecador con pentóxi-- do de fósforo. Se pesó. La diferencia entre esta pesada y la tara - del crisol es la fibra ácido-detergente.

2.2.2.7.- Celulosa y lignina.

Se siguió la técnica de VAN SOEST y WINE (1968). El crisol que contiene la fibra ácido-detergente se coloca en una bandaja de plástico en la que se pone agua destilada hasta la placa del filtro,

sin que la fibra se humedezca. Se añaden al crisol 25 ml. de solución combinada de permanganato potásico, pasados 5 min. se añaden otros 25 c.c. de la solución de permanganato, cuidando evitar excesivo flujo de solución fuera de los crisoles. Transcurridos 90 min. se filtran y se colocan de nuevo los crisoles en la bandeja; se les añade la solución desmineralizadora. Pasados 5 min. se secan succionando y se vuelve a añadir solución desmineralizadora, que se deja actuar 20-25 min. Se seca de nuevo succionando y se lava 2 veces -- con etanol al 80 % y otras dos veces con acetona. Se seca en estufa durante 8 horas y se pesa previamente enfriado en desecador.

La proporción de lignina de la muestra se calcula como la -- pérdida de peso a partir de la fibra ácido detergente.

Se incinera, a continuación, el residuo a 500°C durante 3 horas, se enfria y pesa.

La celulosa se calcula como la pérdida de materia orgánica -- durante la incineración.

2.2.2.8.- Hemicelulosas.

Estimadas por diferencia entre fibra neutro-detergente y fibra ácido-detergente (COLBOURN y EVANS, 1967).

2.2.2.9.- Cenizas y minerales.

La determinación de cenizas se efectuó siguiendo los métodos habituales de laboratorio. Las muestras de aproximadamente 2 g, se incineraron en horno mufla a temperatura inicial de 250-300°C hasta desaparición de humos, llegando a los 400-450°C durante un periodo posterior de aproximadamente 4 horas.

Las cenizas así obtenidas se disolvieron según el método DUQUE (1971) en una mezcla de $\text{ClH}-\text{NO}_3\text{H}$ -agua destilada (1:1:8) y filtradas; posteriormente se adicionó agua destilada hasta un volumen de 25 m. De esta solución madre se tomaron partes alícuotas para la determinación de los siguientes minerales: (calcio, magnesio, hierro, zinc, - cobre, manganeso y fósforo). El análisis de los seis primeros se hizo siguiendo la técnica de espectrofotometría de llama empleando un espectrofotómetro de absorción atómica(1). El fósforo se determinó siguiendo el método de DUQUE(1971) por colorimetría, mediante el método del amarillo de vanadomolibdofosfórico(2).

2.2.2.10.- Análisis de aminoácidos.

Los aminoácidos: aspártico, treonina, serina, glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina y arginina, fueron determinados por el método de SPACKMAN, STEIN y MOORE(1958). El análisis se realizó en un autoanalizador Hitachi Perkin Elmer modelo 034, utilizando columnas de 500 mm y 100 mm con cerina esférica nº 3105.

La muestra (100 mg) fué hidrolizada con ClH 6 N (400 ml) a reflujo y haciendo burbujear una corriente de nitrógeno durante 22 horas. Se utilizó norleucina como standard interno.

Para la determinación de la cistina se hizo una previa oxidación con ácido perbórmico, de acuerdo con el método de MOORE(1963).

2.2.3.- Valoración nutritiva

2.2.3.1.- Digestibilidad de la sustancia seca, valor D y unidades alimenticias.

- Digestibilidad "in vitro": Esta técnica trata de reproducir - las 2 etapas naturales que ocurren en los procesos de digestión de los rumiantes, para lo cual, se somete primeramente el forraje a una digestión utilizando microorganismos que se obtienen del líquido ruminal de una oveja fistulada. Más tarde, se continúa esta digestión

utilizando pepsina ácida.

En la primera etapa los hidratos de carbono complejos (celulosa, + hemicelulosas) se digieren y convierten en productos solubles por acción de los enzimas de los microorganismos inoculados. Los azúcares simples producto de esta digestión se convierten a su vez en ácidos grasos volátiles produciéndose además metano, CO_2 , etc. En esta etapa solo se solubiliza una proporción de la proteína. Para que se realice la segunda parte del proceso de digestión se requiere la acción de la pepsina que convierte la proteína en una fracción hidrosoluble.

Método: Se siguió la técnica de TILLEY y TERRY (1963). Después de secar el forraje en estufa a 100°C , se pesan muestras de 0,5 g por triplicado dejando dos tubos de testigos sin forraje alguno. A continuación se agregan a cada tubo 40 ml de una solución tampón de fosfato-bicarbonato (saliva artificial, a una temperatura de 38°C y saturada con CO_2) de la siguiente composición:

$\text{PO}_4\text{H Na}_2$	9,3 g
$\text{CO}_3\text{H Na}$	9,8 g
ClNa	0,47 g
ClK	0,57 "
Cl_2Ca	0,04 "
Cl_2Mg	0,06 "

(a enrasar en 1 litro de agua destilada)

Inmediatamente después de añadir la solución tampón se agregan 10 ml de líquido de rúmen a cada tubo, este líquido se extrae momentos antes de un cordero fistulado que en los últimos días se ha alimentado con 1 kg de alfalfa y 200 g de concentrado. Se inau-

fla CO_2 en cada tubo para desplazar todo el aire y se tapa con un tapón con válvula de seguridad manteniendo todo en incubación a 38-39°C durante 48 horas en ambiente oscuro agitándose unas 4 ó 5 veces durante este tiempo. A las 6 y 24 horas se determine el pH ajustándolo a un valor de 6,9 con solución normal de Na_2CO_3 (1 ml de Na_2CO_3 1 N sube el pH en 0,2 unidades aproximadamente). Antes de volver a colocarlos en una estufa de incubación, vuelven a burbujaerse los tubos de CO_2 . Después de las 48 horas, se sacan los tubos de la estufa de incubación y se paraliza la actividad bacteriana adicionando 1 ml de solución de Hg Cl_2 al 5 % guardándolos a 18°C hasta el momento de centrifugarlos. La centrifugación, que dura 15 min. a 1800 g, permite eliminar las partículas que sobrenadan, y los residuos insolubles se lavan.

Al residuo de cada tubo se agregan 50 ml de solución de la pepsina ácida, se incuban de nuevo 48 horas a 38-39°C agitándose y se guardan a 18°C, hasta el momento de centrifugarlos. Después de la centrifugación, durante 1 min. a 1.800 g, se eliminan las partículas que sobrenadan y los residuos "indigeridos" se lavan nuevamente con agua. Cada residuo se pasa a crisoles de peso conocido (50-100 ml de capacidad). Se colocan en la estufa a 100°C hasta peso constante. La sustancia seca residual se calcula restando el peso del recipiente (crisoles porosos).

El peso del residuo en los tubos testigos (a los que se añadió solamente líquido de la panza y solución tampón) comprende la fracción indigestible de las partículas alimenticias y los microorganismos extraídos con los 10 ml del líquido del tórmen originales. Este peso se resta del peso del residuo encontrado en cada tubo de ---

"muestra problema" (de digestibilidad conocida) para determinar el peso del residuo indigestible de cada 0,5 g de forraje. A partir de esto, ya puede calcularse fácilmente la sustancia digestible en cada 100 g de muestra (materia seca).

.- La digestibilidad de la materia seca fué también estimada mediante la ecuación sumativa de VAN SOEST (1965), y VAN SOEST y WINE (1968).

.- El valor D fué calculado mediante la ecuación de OSBOURN y col. 1971. Las unidades alimenticias se calcularon mediante la fórmula de BREIREM (citado por DEMARQUILLY y WEISS, 1970).

2.2.3.2.- Digestibilidad, valor biológico y utilización neta de la proteína.

Fueron determinados por el método de Thomas-Mitchell. Las raciones experimentales se pesaron, mezclaron y envasaron convenientemente (dos series con la cantidad total de alimentos por rata: una para la determinación de N endógeno y N metabólico -3 días de duración- y otra para el experimento de balance -7 días de duración- con la debida antelación al comienzo de las pruebas. Así mismo, y unos días antes, se acondicionó la sala de experimentos así como el resto del material auxiliar, según descripción de OCIO (1961).

Una vez formados los grupos experimentales de animales (dos de siete ratas macho cada uno), que deben diferir entre sí en 1 ó 2 g como máximo, se sitúan las ratas en las jaulas correspondientes.

Se requiere un periodo previo de acostumbramiento a la dieta de 4 días de duración, durante el cual no se coleccionaron las he-

res ni la orina. En este periodo se administró una dieta preparada igual que en el periodo siguiente, pero se administró "ad libitum" ya que no es necesario controlar la ingestión de alimento. El pienso del cuarto día fué coloreado con carmín para señalar el comienzo del experimento.

El primer día de experimento propiamente dicho, conducente a la determinación de los valores básicos se comenzó a las 11 de la mañana. Se pesaron las ratas, se limpiaron los restos de pienso que habian quedado en el periodo previo y se administró un tercio del pienso de la primera serie de frescos.

Se situaron convenientemente los dispositivos separadores de excremento.

El segundo día se administró el pienso diario (otro tercio en total) y se retiraron las heces rojas aparecidas y que corresponden al cuarto día de acostumbamiento, coleccionándose las heces blancas que corresponden al pienso problema.

Al tercer día se realizaron las mismas operaciones que el día anterior.

El cuarto día, a las 11 de la mañana (72 horas del comienzo del experimento) se dió por terminada la prueba. Se retiraron los dispositivos separadores de excrementos, que se sustituyeron por otros limpios. De esta forma, y ante la imposibilidad de marcar la orina excretada, se recoge la cantidad total de ésta que haya sido evacuada durante la totalidad del periodo experimental.

El experimento de balance de N comenzó a los tres días de concluir el de las determinaciones de valores básicos. Para ello se pe

se pesaron las ratas, se cambió al fondo-suelo de cada jaula metabólica por otro limpio, se limpiaron los comederos de restos de pienso y se administró el primer pienso de la segunda serie de frascos, correspondientes al experimento de balance. El pienso del día anterior se coloreó así mismo con carmín para marcar el inicio del experimento de balance.

Se colocó una nueva serie limpia de dispositivos separadores de excrementos en los que se coleccionaron las heces y orine del experimento de balance.

El segundo día del experimento de balance aparecieron las heces blancas que corresponden al primer pienso del experimento de balance y que son coleccionados.

Diariamente se realizaron las siguientes operaciones: administrar el pienso correspondiente a cada rate, así como el agua necesaria, y retirar las heces depositadas el día anterior.

El octavo día se administró un pienso cualquiera coloreado convenientemente y se esperó el fin de la experiencia, que está marcado por la aparición de las primeras heces coloreadas. No obstante, a las 11 de la mañana, se cambiaron los dispositivos separadores con el fin de recoger la orine excretada exactamente en 7 días.

Se pesaron las ratas, así como los restos de piensos.

Se hicieron dos experimentos: uno para determinación del valor biológico del concentrado de guisante y otro para estudiar el efecto de suplementación con metionina.

Experimento nº 1:

Table nº 6.- COMPOSICION DE LA DIETA PARA LA DETERMINACION DE NITROGENO ENDOGENO Y NITROGENO METABOLICO.

<u>I n g r e d i e n t e s</u>	<u>Ración % (g.g.)</u>
Albúmina de huevo, comercial (1)	4,80
Celulosa en polvo	5,00
Sacarosa	8,00
Aceite de girasol	5,00
Complejo vitamínico (2)	1,00
Mezcla mineral (3)	5,00
Almidón	71,20
	<hr/> 100,00

- (1) 83,42 % de proteína bruta en sustancia seca.
- (2) El complejo vitamínico aportó por kilogramo de pienso: 5.000 U.I. de vitamina A, 1.000 U.I. de vitamina D₃, 50 mg de vitamina E, - 2 mg de vitamina B₁, 5 mg de vitamina B₂, 12 mg de pantotenato cálcico, 30 microgramos de vitamina B₁₂, 2 mg de vitamina B₆ y 1 g de cloruro de colina.
- (3) La mezcla mineral contenía: 14,60 g de (PO₄H₂)₂ Ca, 9,25 g de CO₃Ca, 6,20 g de PO₄H₂K, 1,25 g de ClNa, 4,40 g de SO₄Mg 7 H₂O, 0,153 g de SO₄Mn H₂O, 0,089 g de (SO₄)₃ Fe 2.2H₂O, 0,020 g de SO₄Cu.5H₂O, 0,052 SO₄Zn.7H₂O, y 0,0002 g de I K por kilogramo de dieta.

Tabla nº 7.- COMPOSICION DE LAS DIETAS PARA LA DETERMINACION DEL VALOR BIOLOGICO DE LA PROTEINA DE CONCENTRADO PRO--TEICO (CPE) DE LA PLANTA DESGRANADA DE GUIBANTE *Pisum sativum*, L.

Ingredientes	Raciones	
	Testigo % S.S.	Problema % S.S.
CPF (1)	-	26,50
Celulosa en polvo	5,00	5,00
Sacarosa	28,40	22,60
Almidón	43,60	34,90
Aceite de girasol	5,00	5,00
Complejo vitamínico (2)	1,00	1,00
Mezcla mineral (3)	5,00	5,00
Albúmina de huevo, comercial (4)	12,00	-
	100,00	100,00

- (1) 37,75 % de proteína bruta en sustancia seca.
- (2) El complejo vitamínico aportó por kilogramo de pienso: 5.000 U.I. de vitamina A, 1.000 U.I. de vitamina D₃, 50 mg de vitamina E, - 2 mg de vitamina B₁, 5 mg de vitamina B₂, 12 mg de pantotenato - cálcico, 30 microgramos de vitamina B₁₂, 2 mg de vitamina B₆ y 1 g de cloruro de colina.
- (3) La mezcla mineral contenía: 14,60 g de PO₄H₂)₂ Ca, 9,25 g de CO₃^{Ca}, 6,20 g de PO₄H₂K, 1,25 g de ClNa, 4,40 g de SO₄Mg 7 H₂O, 0,153 g de SO₄Mn H₂O, 0,089 g de (SO₄)₃ Fe₂.2H₂O, 0,020 g de SO₄Cu.5H₂O, 0,052 SO₄Zn.7H₂O, y 0,0002 g de I K por kilogramo de dieta.
- (4) 83,42 % de proteína bruta en sustancia seca.

Para la determinación de los valores básicos, los dos grupos de animales recibieron la dieta detallada en la tabla núm. 6.

Para la determinación del valor biológico un grupo actuó como testigo ingiriendo una ración cuya fuente protéica era albúmina de huevo comercial y el otro recibió una dieta isoprotéica respecto a la anterior, pero la proteína era aportada por el concentrado protéico de la planta desgranada de guisantes (tabla núm. 7.).

Experimento nº 2:

Se operó como en el experimento anterior, las raciones fueron preparadas de la misma manera, pero la dieta problema se suplementó con metionina, que es el primer aminoácido limitante encontrado en los análisis químicos, en la proporción de 0,30 por 100.

En ambos casos, se utilizaron ratas wistar procedentes del criadero del Instituto de Alimentación y Productividad Animal (C.S. I.C.) en que todos los animales son de gran homogeneidad genética.

2.2.4.- Análisis estadístico

Se aplicaron las siguientes pruebas: Análisis de varianza-- (SNEDECOR) y pruebas de comparación de medias (STUDENT y M.L.S.).

(1) Modelo Perkin-Elmer 303.

(2) Modelo DB-G.

3.- RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 RENDIMIENTOS Y COMPOSICION DE LA COSECHA

3.1.1.- RENDIMIENTOS

Se determinaron en primer lugar y como dato previo de interés los rendimientos de la cosecha en sustancia fresca y sustancia seca con y sin grano.

Los 17.688 kg ha⁻¹ obtenidos de sustancia verde dieron 3.843 kg ha⁻¹, de sustancia seca total y 2.789,5 kg S.S. ha⁻¹ de parte aérea de la planta desgranada de Pisum sativum L. Hay que señalar que el rendimiento de legumbres frescas: 10.264 kg ha⁻¹ fué muy semejante al obtenido por RODRIGO y col. (1972) en Murcia durante la temporada 1972 (10.700 kg ha⁻¹) para dicha variedad, pero un 50 % inferior a los 16.500 y 17.700 kg ha⁻¹, que se alcanzaron en las temporadas de 1971 y 1972, respectivamanta, en Navarra.

En la materia seca la razón legumbre/resto de parte aérea de la planta, fué 52,10 y la razón: grano/vaina 52,58. Estos valores son comparables, aunque ligeramente superiores, a los citados para la variedad empleada, "Dark Skin Perfection": alrededor de 50 % ambas razones (Dirección de Agricultura y Ganadería, 1972).

3.1.2.- PARTICION DEL NITROGENO EN LA SUSTANCIA SECA.

En la tabla 8 se den, en consecuencia, las proporciones de nitrógeno total, nitrógeno extraíble con alcohol al 80 %, nitrógeno de péptidos, nitrógeno no protéico y nitrógeno protéico, así como los porcentajes de nitrógeno extraíble con elcohol, nitrógeno de péptidos y nitrógeno no protéico respecto al nitrógeno total, en la sustancia seca de la planta, una vez desgranada y triturada en los

12 fraccionamientos realizados.

3.1.2.1.- El nitrógeno total alcanzó un valor promedio de 2,75 % - de la materia seca. Dicho valor viene a representar alrededor de un 17 % de proteína bruta ($N \times 6,25$)-habida cuenta de la escasa proporción de nitrógeno nítrico que contiene esta planta- valor comparable a los obtenidos para este subproducto por otros autores (SANCHEZ VIZCAINO y col. 1971 obtuvieron un 16,48 % en 6.6.).

3.1.2.2.- El nitrógeno extraíble con alcohol al 80 % que corresponde al nitrógeno nítrico, amínico, amídico y amoniacal así como - el de los aminoácidos libres y otros compuestos de nitrógeno inorgánico u orgánico en sus formas más simples, incluye también, según - FAUCONEAU (1960), un 10 % de péptidos ligados a pigmentos. Dicha -- fracción nitrogenada representó el 0,77 % de la sustancia seca, y el 27,74 % del nitrógeno total que contenía la cosecha.

3.1.2.3.- El nitrógeno de péptidos viene a ser la mitad del extraíble con alcohol al 80 %. La media de las determinaciones efectuadas da un 0,38 % de la materia seca, y un 13,85 % del nitrógeno total.

3.1.2.4.- Si se suman los promedios de las dos fracciones citadas, se obtiene que el total de nitrógeno no protéico alcanza el 1,15 % de la materia seca. Del mismo modo deducimos que el total de nitrógeno no protéico (N extraíble con alcohol + N . de péptidos) representa el 41,60 % del N total. Del N no protéico el N de péptidos representó el 33 % es decir igual relación que la obtenida por TREVIÑO y col. (1978) para la alfalfa.

Esta elevada proporción de nitrógeno en forma no protéica es

superior a los valores encontrados por otros autores para plantas de la misma familia, como la alfalfa (Medicago sativa, L.). FAUCONEAU (1960), por ejemplo, en planta entera de alfalfa antes de la floración obtuvo un valor máximo de 36 % de N no protéico respecto al N total. Según este autor la proporción de N no protéico referido al N total varía poco con la edad de la planta. Así mismo, TREVINO y col. (1978) en experimentos con alfalfa "Aragon" obtuvieron máximos del 30 % sobre el N total, al inicio de floración y en plena floración, encontrando también dicha proporción bastante constante a lo largo del ciclo de desarrollo.

El dato de nitrógeno no protéico es importante porque permite explicar el rendimiento en concentrado protéico foliar, que se estudiará más adelante.

1.2.5.- El nitrógeno de proteína verdadera-calculado como la diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno no-protéico- resulta por consiguiente 1,60 % y representa el 58,18 % del nitrógeno total.

Tabla 8.- PARTICION DEL NITROGENO EN LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L.

Fracciones miento.	(en % de la substancia seca)						
	Nitrógeno total(t)	Nitrógeno extraíble con alco- hol al 80 % (a).	% de (a) respecto a (t)	Nitrógeno de pépti- dos (b).	% de (b) respecto a (t)	Nitrógeno no protéi- co.(a)+(b)	% de nitrógeno no protéico -- respecto al -- total.
1	2,76	0,66	23,91	0,42	15,21	1,08	39,11
2	2,74	0,80	29,19	0,37	13,50	1,17	42,70
3	2,52	0,67	26,59	0,31	12,30	0,98	38,89
4	2,92	0,70	23,97	0,35	11,99	1,05	35,96
5	2,55	0,70	27,45	0,33	12,94	1,03	40,39
6	2,63	0,68	25,85	0,39	14,83	1,07	40,68
7	2,70	0,68	25,18	0,41	15,18	1,09	40,36
8	2,82	0,87	30,85	0,44	15,60	1,31	46,45
9	3,00	0,94	31,33	0,42	14,00	1,36	45,33
10	2,73	0,79	28,94	0,38	13,92	1,17	42,86
11	2,99	0,93	31,10	0,43	14,38	1,36	45,48
12	2,66	0,76	28,57	0,33	12,40	1,09	40,97
\bar{x}	2,75	0,77	27,74	0,38	13,85	1,15	41,60
σ^{n-1}	0,16	0,10	2,67	0,04	1,24	0,13	3,09
C.V.	5,82	12,99	9,62	10,53	8,95	11,30	7,43
							6,25

3.2.- RENDIMIENTOS Y COMPOSICION DE LAS FRACCIONES.

Como ya se dijo anteriormente, los productos finales del fraccionamiento de las cosechas verdes mediante los procedimientos habituales pueden reducirse a tres: residuo fibroso que queda después de la trituration y prensado; suero o jugo desproteinizado, - que contiene los compuestos solubles no coagulables, y concentrado proteínico folier (CPF) más o menos depurado, que constituye, como es lógico, el producto principal. Lo que llamamos zumo es una fracción intermedia muy importante que contiene todos los compuestos - extraídos durante la trituration y prensado, del cual puede precipitarse la proteína o bien utilizarse sin ulterior coagulación.

En las tablas 9, 10 y 11 y en las figuras 4, 5 y 6 se exponen los datos medios de composición y rendimientos de los diferentes fraccionamientos y fase a que se sometieron las plantas de Pisum sativum una vez desgranadas. Los datos básicos que se detallan en las tablas 12, 13, 20, 21, 22 y 24 se discutirán más adelante, al estudiar por separado cada una de las referidas fracciones: residuo fibroso, zumo y CPF. Hemos prescindido del suero por su reducida importancia cualitativa máxima teniendo en cuenta el - elevado grado de dilución de los compuestos que contiene como consecuencia del método de fraccionamiento empleado, que implica la - edición de agua como se expresó anteriormente.

Tabla 9.- RENDIMIENTOS DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum* L.

Fracciona- miento nº	Fecha	Residuo fibroso	(kg de substancia seca ha ⁻¹)				Concentrados		Total
			Zumos		Total	1ª fase	2ª fase		
			1ª fase	2ª fase					
1	18-XI-77	1713,59	835,18	229,85	1065,03	100,42	29,57	129,99	
2	25-XI-77	1723,35	909,10	217,02	1126,12	104,33	28,73	133,06	
3	2-XII-77	1663,66	933,65	250,78	1184,43	102,65	28,17	130,82	
4	14-XII-77	1637,71	728,62	218,14	946,76	102,37	22,87	125,24	
5	26-I-78	1594,48	710,21	201,96	912,17	69,74	17,85	87,59	
6	9-II-78	1765,75	771,30	304,89	1076,19	83,96	22,32	106,28	
7	16-II-78	1674,82	824,02	185,50	1009,52	76,43	16,74	93,17	
8	23-II-78	1505,77	772,13	206,98	979,11	76,43	18,69	95,12	
9	15-III-78	1656,13	873,95	251,33	1125,28	96,80	20,92	117,72	
10	6-IV-78	1766,87	811,74	166,81	978,55	88,43	22,59	111,02	
11	20-IV-78	1627,67	712,44	219,81	932,25	57,18	14,50	71,68	
12	11-V-78	1540,36	819,00	206,70	1025,70	82,29	20,08	102,37	
\bar{x}		1655,85	808,44	221,65	1030,09	86,75	21,92	108,67	
σ_{n-1}		81,72	73,31	35,55	86,11	15,08	4,85	19,50	
C.V.		4,93	1,65	16,04	8,36	17,38	22,12	17,94	

Tabla 10.- VALORES MEDIOS* DE LOS RENDIMIENTOS Y LA COMPOSICION DE LOS PRODUCTOS PRINCIPALES DEL
FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L.
(Datos relativos a substancia seca y nitrógeno total)

	Planta desgranada	Residuo fibroso	Zumo de la 1ª fase	Zumo de la 2ª fase	Total extraído	Total	CPF de		CPF total
							la 1ª fase	la 2ª fase	
SUBSTANCIA SECA									
%	34,43	17,82	3,81	1,07			95,11	93,57	
kg ha ⁻¹	2789,50	1655,85	808,44	221,65	1030,09	2685,94	86,75	21,92	108,67
Recuperada (%)		59,36	28,98	7,94	36,93	96,16	3,11	0,79	3,90
NITROGENO TOTAL									
% (S.S.)	2,75	2,36	3,58	3,55			6,22	5,93	
kg ha ⁻¹	76,71	39,08	28,94	7,87	36,81	75,89	5,40	1,30	6,80
Recuperada (%)		51,09	38,91	10,42	49,33	100,42	7,39	1,80	9,19

* Son las medias de los resultados detallados en las tablas: 8, 12, 13, 20, 21, 22 y 24 obtenidas en los doce fraccionamientos realizados.

Tabla 11.- VALORES MEDIOS* DE LOS RENDIMIENTOS Y LA COMPOSICION DE
LOS PRODUCTOS PRINCIPALES DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLAN-
TA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L.

(Partición del nitrógeno en la 1ª fase del proceso de ex-
tracción).

	Planta desgranada	Residuo fibroso	Zumo de la 1ª fase	Total	CPF de la 1ª fase
N EXTRAIBLE CON ALCOHOL AL 80 %					
% (S.S.)	0,77	0,263	1,58		0,439
%(del N total)	27,74	11,18	43,01		7,06
kg ha ⁻¹	21,48	4,35	12,77	17,12	0,38
Recuperado(%)		20,25	59,45	79,70	1,77
N DE PEPTIDOS					
% (S.S.)	0,38	0,194	0,66		0,06
%(del N total)	13,85	8,23	18,38		0,97
kg ha ⁻¹	10,60	3,21	5,33	8,54	0,05
Recuperado (%)		30,28	50,28	80,57	0,47
N NO PROTEICO					
% (S.S.)	1,15	0,460	2,25		0,49
%(del N total)	41,60	19,41	63,05		7,93
kg ha ⁻¹	32,08	7,62	18,19	25,81	0,42
Recuperado (%)		23,75	56,70	80,45	1,31
N PROTEICO					
% (S.S.)	1,60	1,90	1,33		5,75
%(del N total)	58,18	80,51	37,15		92,12
kg ha ⁻¹	44,63	31,46	10,75	42,21	4,99
Recuperado (%)		70,32	24,80	95,12	11,61

* Son las medias de los valores detallados en las tablas: 8, 12, 13,
20, 21, 22 y 24, obtenidos en los doce fraccionamientos realiza-
dos.

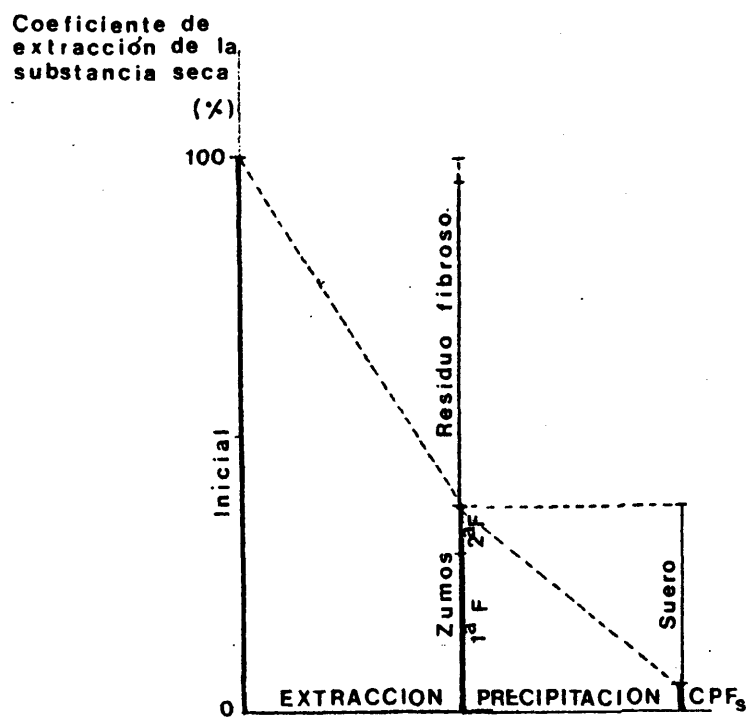


Figura 4.- COEFICIENTES DE EXTRACCION DE LA SUBSTANCIA SECA EN EL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE Pisum sativum, L.

Coefficiente de
extracción del
N total (%)

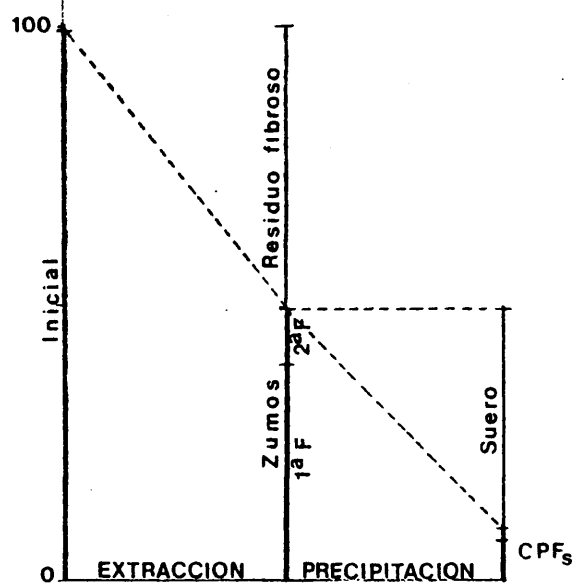


Figura 5.- COEFICIENTES DE EXTRACCION DEL NITROGENO TOTAL EN EL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE Pisum sativum, L.

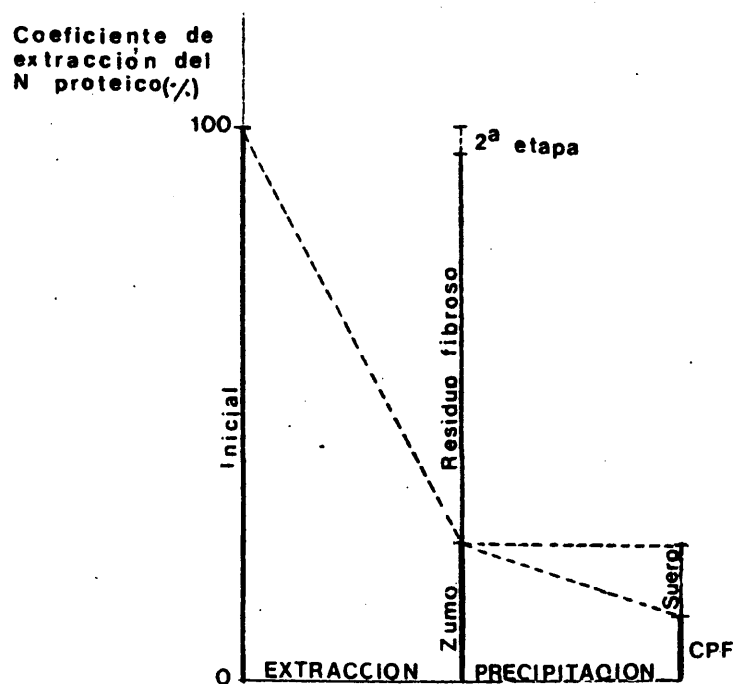


Figura 6.- COEFICIENTES DE EXTRACCION DEL NITROGENO PROTEICO EN EL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE Pisum sativum, L.

3.2.1.- RESIDUO FIBROSO.

3.2.1.1.- RENDIMIENTOS.- Como puede verse en la tabla 9, el fraccionamiento dió un rendimiento medio de 1655,85 kg ha⁻¹ de sustancia seca en forma de residuo fibroso. Si se tiene en cuenta que la sustancia seca recolectada por hectárea en forma de planta desgranada fué de 2.789,5 kg, ello quiere decir que se retiene en este subproducto muy cerca del 60 por ciento de la sustancia seca inicial después de haber sido sometida a las dos fases de extracción.

Estos resultados están en línea con los ampliamente variables de la bibliografía consultada, dependientes en gran medida de la naturaleza y características del material de partida. Por lo general dicho valor suele representar entre el 50 y el 80 %, Sobre ello se insistirá más al valorar el rendimiento del zumo.

3.2.1.2.- PARTICION DEL NITROGENO EN LA SUBSTANCIA SECA.

Con la finalidad de conocer la partición de los compuestos de nitrógeno de la cosecha en el proceso de fraccionamiento se valoraron el N total, el N extraíble con alcohol y el N de péptidos. Se calcularon también los tantos por cientos de cada uno de los dos últimos respecto del primero, el nitrógeno no protéico (considerado como suma del extraíble con alcohol y el de péptidos), el tanto por ciento de nitrógeno no protéico respecto del total, y el N protéico como diferencia de N total y N no protéico. Los resultados se muestran en las tablas 10, 11, 12 y 13.

3.2.1.2.1.- El promedio de nitrógeno total fué 2,36 % de la sustancia seca, valor un 14 por ciento inferior al de la cosecha inicial, como cabía esperar dada la principal localización de este

bioelemento en los protoplastos y su escasez en las paredes celulares. Sin embargo, hemos de señalar que el grado de extracción resultó inferior el obtenido en otras cosechas; y así CONNELL y HOUSEMAN (1977) en la revisión de este tema indican que el fraccionamiento -- puede reducir la proteína bruta ($N \text{ Kjeldahl} \times 6,25$) hasta un 25 % -- aunque con cosechas muy ricas en sustancia seca se extrae menos.

Teniendo en cuenta la sustancia seca recuperada en el residuo fibroso y la referida proporción se pueda estimar que aproximadamente se recupere la mitad (51,09 %) del N total de la planta desgranada de P. sativum en el residuo fibroso durante las dos fases -- de la extracción.

3.2.1.2.2.- La proporción de nitrógeno extraíble con alcohol -- al 80 % en la sustancia seca y el porcentaje que este representa -- del nitrógeno total fueron, como promedio, 0,263 % y 11,8 % respectivamente (tabla 12). Esto quiere decir que queda en el residuo fibroso aproximadamente un 20,25 % del nitrógeno extraíble con alcohol al 80 % de la planta completa.

3.2.1.2.3.- El nitrógeno de péptidos fué 0,194 % de la sustancia seca y 8,23 % del nitrógeno total. Por consiguiente se recupera en el residuo fibroso 30,28 % del nitrógeno de péptidos.

3.2.1.2.4.- A partir de estos datos se deduce que el nitrógeno no protéico del residuo fibroso representa un 0,460 % de la sustancia seca y un 19,41 % del nitrógeno total. Y que permanecen en esta -- fracción el 23,75 % del nitrógeno no protéico total de la planta -- desgranada de P. sativum.

3.2.1.2.5.- Restando ahora del nitrógeno total el nitrógeno no

Tabla 12.- PARTICION DEL NITROGENO DEL RESIDUO FIBROSO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA
DESCORNADA DE *Pisum sativum*, L.

Fracciones miento.	Nitrogeno total (t)	(en % de la substancia seca)						N no proteico (a) + (b)	% de (a)+(b) respecto a (t)	N proteico
		N extraible con alcohol al 80 % (a)	% de (a) respecto a (t)	N de peptidos (b)	% de (b) respecto a (t)					
1	2,44	0,290	11,88	0,175	7,12	0,465	19,00	1,975		
2	2,37	0,285	12,02	0,230	9,70	0,515	21,72	1,855		
3	2,19	0,310	14,15	0,210	9,59	0,520	23,74	1,670		
4	2,73	0,275	10,07	0,240	8,79	0,515	18,86	2,215		
5	2,26	0,300	13,27	0,155	6,86	0,455	20,13	1,805		
6	2,23	0,205	9,19	0,160	7,17	0,365	16,36	1,865		
7	2,25	0,320	14,22	0,185	8,22	0,505	22,44	1,745		
8	2,40	0,180	7,50	0,150	6,25	0,330	13,75	2,070		
9	2,36	0,215	9,11	0,160	6,78	0,375	15,89	1,985		
10	2,25	0,200	8,89	0,215	9,55	0,415	18,44	1,835		
11	2,43	0,340	13,99	0,210	8,64	0,550	22,63	1,880		
12	2,38	0,235	9,87	0,240	10,08	0,475	19,95	1,905		
\bar{x}	2,36	0,263	11,18	0,194	8,23	0,460	19,41	1,90		
σ n-1	0,14	0,05	2,36	0,03	1,34	0,07	3,01	0,15		
C.V.	5,93	19,01	21,11	15,46	16,28	15,22	15,51	7,89		

Tabla 13.- COEFICIENTES DE EXTRACCION DEL RESIDUO FIBROSO DEL
FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum*
sativum, L.

(en %)

Fraccionamiento nº	Substancia seca	Nitrógeno total	Nitrógeno protéico
1	61,43	54,30	72,22
2	61,78	53,44	73,01
3	59,64	51,83	64,70
4	58,71	54,88	69,51
5	57,16	50,66	67,79
6	63,30	53,68	75,66
7	60,04	50,02	65,06
8	53,98	45,94	73,99
9	59,37	45,51	70,04
10	63,34	52,20	74,51
11	88,35	47,42*	67,32*
12	55,22	49,41	66,99
\bar{x}	59,36	51,09	70,32
$\sqrt{n-1}$	2,93	3,17	3,84
C.V.	4,94	6,20	5,46

* No se han considerado estos valores porque sus correspondientes de la planta desgranada están fuera de los márgenes de -- confianza.

protéico obtenemos el nitrógeno protéico. La proporción de éste en la substancia seca del residuo fibroso alcanza consiguientemente - un 1,9 % y el 80,51 % del nitrógeno total. Traducido a porcentaje ello implica que aproximadamente el 70 % del nitrógeno protéico - del material inicial es retenido en el residuo fibroso (tabla 13).

3.2.1.3.- COMPOSICION QUIMICO-BROMATOLOGICA.

Pese a su importancia cuantitativa (representa casi el 60 % en peso de la substancia seca total de la cosecha) y a su indudable interés para la alimentación de los herbívoros en general y de los rumiantes en particular, no se han hecho muchos estudios sobre la composición químico-bromatológica y el valor nutritivo de los - residuos fibrosos resultantes de la extracción de las proteínas foliares.

En las tablas 14 y 15 se exponen los resultados de nuestros análisis; los cuales incluyeron, además de los referentes a la - - fracción nitrógeno -ya citados-: extracto etéreo, fibra neutro-detergente, fibra ácido-detergente, lignina-permanganato, celulosa-permanganato, cenizas brutas y minerales (macro y microelementos). Las hemicelulosas se calcularon a partir de las fibras neutro y -- ácido-detergente.

3.2.1.3.1.- Los correspondientes datos ponen de manifiesto que se trata de un alimento especialmente apto para rumiantes por la elevada proporción de fibra neutro-detergente, (55,73 %), de fibra ácido-detergente (45,23)% y de celulosa-permanganato (31,06 %) en la substancia seca. Este último dato es de gran interés pues, como es bien sabido, la celulosa, cuando no va acompañada (protegida) por una -

Tabla 14.- COMPOSICION QUIMICO-BROMATOLOGICA DEL RESIDUO FIBROSO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L.

Fraccionamiento.	(en % de la substancia seca).					Hemicelulosas
	Extracto etéreo.	Fibra neutro detergente.	Fibra ácido-detergente.	Lignina permanganato.	Cellulosa permanganato.	
1	4,07	53,38	44,32	12,63	30,65	9,06
2	3,51	55,85	46,78	12,96	31,61	10,07
3	4,08	62,80	53,05	17,28	34,87	9,75
4	3,75	59,53	49,87	15,52	32,15	9,66
5	3,82	53,61	42,62	11,80	28,76	10,99
6	4,09	54,63	43,30	13,62	27,93	11,33
7	4,26	55,70	43,95	12,06	29,35	11,75
8	5,00	57,46	44,63	11,57	32,63	12,83
9	4,94	56,03	45,75	12,47	32,92	10,28
10	4,33	54,29	44,42	11,31	32,54	9,47
11	4,34	51,08	41,67	12,03	29,45	9,41
12	4,05	54,38	43,31	13,17	29,90	11,07
\bar{x}	4,19	55,73	45,23	13,03	31,06	10,51
σ_{n-1}	0,44	3,08	3,21	1,75	2,05	1,10
C.V.	10,50	5,53	7,10	13,43	6,60	10,47

Tabla 15.- COMPOSICION MINERAL DEL RESIDUO FIBROSO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRA-
NADA DE *Pisum sativum*, L.

Fracciona- miento. nº	Cenizas brutas % (S.S.).	Ca % (S.S.)	P % (S.S.)	Mg % (S.S.)	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
1	5,75	1,21	0,15	0,15	330	26,49	6,18	58,93
2	5,81	1,28	0,16	0,16	338	27,17	7,93	60,90
3	5,76	1,23	0,14	0,15	331	27,03	7,15	59,91
4	5,78	1,24	0,15	0,15	333	26,63	7,26	59,90
5	5,86	1,21	0,10	0,14	210	24,75	6,72	46,24
6	5,88	1,25	0,11	0,15	226	24,87	6,85	46,77
7	5,88	1,26	0,11	0,14	228	24,87	6,84	46,52
8	5,90	1,28	0,12	0,15	243	24,99	6,99	46,47
9	5,48	1,13	0,13	0,13	234	22,54	6,94	51,78
10	5,49	1,15	0,13	0,13	255	22,80	6,83	53,98
11	5,49	1,14	0,14	0,13	259	22,84	6,98	53,80
12	5,50	1,18	0,14	0,14	280	22,84	7,10	56,01
<hr/>								
\bar{x}	5,71	1,21	0,13	0,14	272,25	24,82	6,98	53,43
σ_{n-1}	0,17	0,05	0,02	0,01	48,26	1,74	0,40	5,81
C.V.	2,98	4,13	15,38	7,14	17,73	7,01	5,73	10,87

gran cantidad de lignina, como en este caso (13,03 %) es fácilmente desdoblada por los microorganismos de la panza del rumiante, - liberando ácidos grasos esenciales (acético, propiónico y butírico) metabolitos fundamentales para el animal.

Cuando se comparan estos datos con los de otros residuos - fibrosos (tabla 16) o con los de la alfalfa y la paja de trigo (tabla 17) salta a la vista que el residuo fibroso de la planta desgranada de guisante tiene una composición intermedia entre éstos dos últimos tanto en fibra ácido-detergente como fibra neutro-detergente y celulosa, aproximándose mucho a la primera, a la alfalfa, en calcio (1,21 %) y fósforo (0,13 %). La riqueza en proteína (14,7 %) es algo inferior a la de los residuos fibrosos de alfalfa (16 %) y de gramíneas (15 %) pero igual o mayor que el del heno de alfalfa que contiene alrededor del 14,5 %.

3.2.1.3.2.- La proporción de extracto etéreo alcanzó un valor medio de 4,19 % de la S.S. Este valor, en oposición a los anteriores, es muy inferior al que da el concentrado proteínico foliar - (13,59 %), aunque es mayor que en la mayoría de productos comparables. Sin embargo hay que destacar que el éter sulfúrico o éter - etílico, extrae, como es bien sabido, no solo los triglicéridos - sino también otro grupo de componentes (mono y diglicéridos, ceras, ácidos grasos, pigmentos, lípidos complejos) algunos de los cuales no tienen relación alguna con aquellos y, desde luego, con un valor nutritivo muy inferior o, en algunos casos nulo, como ocurre con las ceras. Los lípidos, los componentes más importantes del extracto etéreo, se encuentran en su mayor parte en los - .protoplastos; las ceras, por el contrario, se hallan recubriendo -

las paredes celulares. En cualquier caso, no cabe esperar que el extracto estéreo represente una fuente importante de energía ni de metabolitos esenciales (ácidos grasos insaturados) por la pequeña proporción que en los mismos deben tener los triglicéridos (que se encuentran principalmente en frutos y semillas, pero escasamente en otros órganos de las plantas).

De lo anterior se desprende la relativamente escasa significación de esta fracción en la alimentación de los rumiantes. El pequeño aporte de ácidos grasos insaturados que pudiera contener, se compensaría con la actividad hidrogenante de los microorganismos del rúmen. Su valor nutritivo habrá que adscribirlo, pues, a los otros componentes: es decir, a los hidratos de carbono y a la proteína, ya citados.

Tabla 16.- COMPOSICION DE LA PLANTA ORIGINAL Y DEL RESIDUO FIBROSO OBTENIDO DE SU FRACCIONAMIENTO (GRAMINEAS Y ALFALFA).

	Gramíneas	Resíduo fibroso de gramíneas.	Alfalfa	Resíduo fibroso de alfalfa.
Humedad %	83	74	80	72
Composición de la materia seca (%)				
Proteína bruta	18	15	20	16
Digestibilidad de la materia orgánica (in vitro)	68	66	58	56
Cenizas totales	10	7	10	7

CONNELL, J., HOUSEMAN, R.A. 1977.- The utilization by ruminants of the pressed green crops from fractionation machinery. In Green Crop Fractionation, WILKINS, R.J. (Ed.). Occasional Symposium No. 9. British Grassland Society. 1977, p. 58

3.2.1.3.3.- Debemos señalar finalmente, que la proporción de cenizas brutas (5,71 %) se encuentra dentro de los límites habituales. Lo mismo puede decirse respecto a los elementos calcio: 1,21 %, fósforo: 0,13 %, magnesio: 0,14 %, hierro: 272,25 ppm, - manganeso: 24,82 ppm., cobre: 6,98 ppm. y Zn: 53,43 ppm. La razón calcio/fósforo ≈ 9 , resulta fuertemente desequilibrada y exigiría el uso de los habituales suplementos fosfóricos.

3.2.1.4.- VALORACION NUTRITIVA.

Los resultados de los parámetros considerados bajo este -- epígrafe se detallan en la tabla 18.

-La digestibilidad determinada "in vitro" por la técnica - de TILLEY y TERRY (1963) fué relativamente alta: 65,59 % de la materia seca. Este valor es exactamente igual que el encontrado por MORENO y col. (1976) para la planta completa de Pisum sativum -- K-248 en floración con la siguiente composición: 14,25 % de S.S.; 29,55 % de FND; 26,1 % de FAD; 19,57 % de celulosa y 7,4 % de lignina, aplicando la ecuación sumativa de VAN SOEST. Y bastante inferior a los citados por CONNELL y HOUSEMAN (1977) para la sustancia seca de la hierba inicial 72,9 % y del residuo fibroso 71 % a partir de ensayos "in vivo" con ganado vacuno.

Es curioso constatar que en estos últimos ensayos la diferencia entre la digestibilidad del residuo fibroso y de la hierba inicial fué muy escasa, apenas 2 unidades (tanto para la sustancia seca como para la materia orgánica), aunque RAYMOND y HARRIS (1957) observaron reducciones de la digestibilidad de la materia seca y orgánica de 6,4 y 5,6 respectivamente, si bien en este caso las plantas fueron pasadas dos veces por una prensa de tornillo.

Tabla 17.- COMPARACION DEL VALOR NUTRITIVO DEL RESIDUO FIBROSO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L., CON OTROS ALIMENTOS GROSEROS (ALFALFA Y PAJA DE TRIGO) UTILIZADOS HABITUALMENTE EN ALIMENTACION DE RUMIANTES.

	F.A.D.	Celulosa	Ca	P	P.B.	U.A./kg.	Valor D.	D.M.S.
Residuo fibroso	45,23	31,06	1,21	0,13	14,7 (1)	0,64	61,70	54,87 (2) 65,70 (3)
Alfalfa	38,00	27,50	1,38	0,29	14,5	0,56	58,00	65,00 (2) 69,00 (3)
Paja de trigo	53,50	33,48	0,235	0,055	3,87	0,46	59,62	49,90 (2) 56,28 (3)

(1) Dicho valor no se refiere estrictamente a proteína bruta, sino a N total x 6,25, pero teniendo en cuenta la baja proporción de nitratos que debe tener esta planta y el pro- caso de fraccionamiento a que ha sido sometida, este dato se aproximará mucho al de -- P.B.

(2) Van Soest.

(3) "in vitro"

Tabla 18.- VALORACION NUTRITIVA DEL RESIDUO FIBROSO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DES-
GRANADA DE *Pisum sativum*, L.

Fraccciona- miento.	Digestibilidad de la substancia seca (1) %	Digestibilidad de la substancia seca (2) %	Valor D	U.A./kg. S.S.
1	56,18	-	63,02	0,67
2	54,98	-	61,87	0,65
3	48,36	64,57	55,91	0,52
4	51,16	65,70	58,46	0,58
5	56,55	66,16	63,27	0,68
6	53,70	66,60	60,88	0,63
7	55,62	65,60	62,41	0,66
8	55,80	66,37	62,43	0,66
9	55,61	66,27	62,36	0,66
10	57,74	63,73	64,24	0,70
11	57,17	65,80	64,00	0,69
12	54,46	65,10	61,52	0,64
\bar{x}	54,77	65,59	61,70	0,64
σ_{n-1}	2,66	0,89	2,38	0,05
C.V.	4,86	1,36	3,86	7,81

(1) VAN SOEST.

(2) "in vitro".

Es también curioso constatar que una estimación de la digesti bilidad mediante la ecuación sumativa de VAN SOEST dió un valor pro medio de 54,77 %. La diferencia entre este valor y el determinado - con la técnica de TILLEY y TERRY es posiblemente el resultado de la dislaceración, maceración y ataque que sufre esta fracción durante el procesado.

Ecuación sumativa de VAN SOEST:

$$y = 0,98 (100 - FND) - 12,9 + FND (1,473 - 0,789 \log \frac{LA}{FAD} 100)$$

Verificáncose la transformación de lignina-permanganato (LP) en lig nina-sulfúrico (LA) mediante la ecuación: $LA = 0,7 LP + 0,24$.

La comparación del residuo fibroso con dos alimentos groseros utilizados habitualmente en la alimentación de los rumiantes (tabla 17) demuestra que se trata de un producto con un valor nutritivo -- equivalente a un heno de alfalfa de calidad media. Tanto la proteí- na bruta, como la energía (U.A. y valor D) y la composición mineral, son muy semejantes.

Ahora bien, para su utilización en la alimentación animal, - sería conveniente estudiar previamente la forma de presentación. - En este sentido es interesante la revisión de este tema llevada a cabo por CONNELL y HOUSEMAN (1977), quienes resumen los principa-- les trabajos realizados con rumiantes utilizando residuos fibrosos presentado de tres formas diferentes: fresco, ensilado y deshidra- tado artificialmente.

-La utilización del residuo fibroso fresco se compara con la cose-- cha de la que procede ofrecida a pesebre en verde. Los resultados en cuanto a aceptabilidad, digestibilidad y ganancia en peso vivo -

del animal, son contradictorios. Por otro lado, debe tenerse en cuenta el peligro de deterioración a corto plazo de este producto.

-La proporción de carbohidratos solubles sería el condicionante de las características del ensilado. Hay que tener en cuenta que el fraccionamiento ocasiona el arrastre de estos compuestos con el zumo, quedando el residuo fibroso empobrecido con relación al material original; ocurre así que los resultados obtenidos por diversos investigadores son en cierto modo contradictorios sobre la facilidad de ensilado de los residuos (RAYMOND y HARRIS, 1957; VARTHA y col., 1973; CONNELL y FOXELL, 1976, DELSCHLEGEL y col., 1969), aunque en el caso del residuo fibroso de alfalfa, las dificultades que apuntábamos, han podido subsanarse mediante la adición de melazas o ácidos. Superadas estas dificultades, el ensilado del residuo fibroso da valores semejantes de ingestión y digestibilidad -- que la cosecha inicial, en los casos estudiados (gramíneas prateses y alfalfa-Medicago sativa L.).

-El residuo deshidratado artificialmente se ha experimentado en alimentación de vacas lecheras y los resultados no parecen ser significativamente diferentes de los obtenidos con la cosecha no fraccionada, cuando el fraccionamiento ha reducido la proporción de proteína bruta y la digestibilidad de la materia orgánica en 4 % y 5 % de la substancia seca, como máximo. Ahora bien, el desecado de este producto supondría un gasto de energía que sería necesario -- cuantificar, para saber el precio del producto final y su repercusión sobre la ración total.

Teniendo en cuenta estos hechos y dada la similitud del valor nutritivo del residuo fibroso de Pisum sativum, L. con los an-

teriormente citados, especialmente con el de alfalfa, pensamos que el ensilado con aditivos (melazas, por ejemplo) sería el método -- más idóneo de conservación y utilización por los animales.

Bajo estos condicionantes, la utilización de dicho residuo supondría el aporte de energía suficiente para producir unos seis millones de litros de leche/año en nuestro país.

Finalmente es preciso resaltar que los datos obtenidos por -- nosotros, aunque rigurosamente contrastados, no tienen más que un valor indicativo. La composición y valor nutritivo del residuo fibroso depende en última instancia de la composición y valor nutritivo de la cosecha total de la cual deriva. Por lo tanto, facto--res tales como suelo, clima, fertilización, especie, estado de -- crecimiento y condiciones de la recolección que influyen en la -- composición química de las cosechas totales influirán en la composición del residuo y zumo, OSTROWSKI (1976).

El equipo utilizado para moler y prensar, también afectará a la composición de los productos del fraccionamiento. Dirigidos en este sentido se encuentran los trabajos de RAYMOND y HARRIS -- (1957), KNUCKLES y col. (1972), SHEPPERSON y col. (1977) y KOEGEL y BRUHN (1977). Con cosechas que difieren únicamente en la humedad, no es posible prefiar máquinas para extraer cantidades específi--cas de zumo y proteína y obtener residuos fibrosos de composición constante. Además, con cosechas muy secas (con menos de 70 % de -- humedad) puede ser necesario añadir agua para conseguir una expresión substancial de nutrientes (SHEPPERSON y col., 1977). En esta situación nos encontramos nosotros.

En esencia, puede resumirse, según CONNELL y HOUSEMAN, que, el fraccionamiento reduce la proteína bruta hasta un 25 %, la digestibilidad "in vitro" de la materia orgánica en un 5 % y las cenizas totales en casi un 35 %.

En la tabla 16 se muestran los valores típicos para residuos fibrosos de gramíneas y alfalfa en que el objetivo prioritario era establecer sistemas de fraccionamiento para granjas, más que extraer intensivamente la proteína.

3.2.2.- ZUMOS

3.2.2.1.- RENDIMIENTOS. Como ya hemos dicho anteriormente, aparte del diferente comportamiento de las plantas según edad, cultivar, o condiciones de explotación, existen factores ligados al sistema de extracción que influyen sobre el rendimiento (coeficiente de extracción) de nitrógeno que se obtiene con el fraccionamiento. Entre estos factores está, como más importante, el pH.

3.2.2.1.1.- Influencia del pH en los rendimientos. La influencia del pH sobre los rendimientos cualitativos y cuantitativos de la extracción proteica, ha sido abordada a lo largo de la historia del estudio de los CPF, fundamentalmente, desde dos puntos de vista diferentes:

a) Sometiendo el jugo extraído en la trituración y prensado de los vegetales a diferentes pH antes de proceder a la coagulación de la proteína. Parece ser que dicho factor juega un papel importante en la calidad físico-química de la proteína. En este sentido existen datos contradictorios:

Para MORRISON y PIRIE (1961), si la precipitación va a realizarse mediante calor, a una temperatura entre 75-80°C, el pH a que se lleve jugo no debe exceder de 6.

SPENCER y col., (1971) obtuvieron los mejores CPF de alfalfa en cuanto a dureza y conservación de carotenos y xantofiles a pHs comprendidos entre 7,5 y 8,5. En este mismo sentido se encuentran las aportaciones de ARKCOLL y HOLDEN (1973) quienes observaron mayores pérdidas de pigmentos en CPFs obtenidos a pHs ácidos. De igual modo, GONZALEZ y col., (1974) obtuvieron el mayor conteni

do en xantofila en CPF de veza procesada a pHs 7 y 8. También GONZALEZ y col. (1977) observaron una recuperación máxima de nitrógeno sometiendo zumo de alfalfa, de coliflor y de brecolera a pH alcalino, mientras que el pH ácido fué más eficaz para veza y acacia tomando como referencia la recuperación de nitrógeno.

b) Otros investigadores como NANDA y col., (1975) han orientado sus trabajos en el sentido de incrementar la solubilización de la proteína en las primeras etapas del procesamiento. Así han estudiado la incidencia que en dicha solubilización tienen el grado de dilución y el nivel de alcalinidad a que se someta la planta después de triturada, pero antes de ser prensada. Ambos factores se consideran clave para la solubilización de las proteínas celulares.

Así, previamente a la elección de las condiciones de procesamiento, realizamos pruebas preliminares en este mismo sentido, sometiendo los zumos diluidos a varios valores de pH. Valoramos las extracciones por la recuperación de nitrógeno total en los zumos, es decir, por el coeficiente de extracción medido en nitrógeno total (% E). Los resultados se indican en la tabla 19. y a partir de ella podemos concluir que:

1ª.- Dichos resultados obtenidos parecen ser coherentes ya que las sumas de los porcentajes de nitrógeno total extraído en los zumos y el retenido en el residuo fibroso son aproximadamente el 100 % respecto del nitrógeno total que contenía la muestra antes de ser procesada. En la mayoría de los casos dichas sumas se encuentran un poco por debajo del 100 %, debido a pequeñas pérdi-

das ocurridas principalmente durante el prensado a que se someten - para separar el zumo del residuo fibroso. Es de destacar que el valor más alto corresponde al procesado a pH 11, lo cual debería influir positivamente en el rendimiento de la extracción, cosa que no ocurre.

28.- Se observa, a diferencia de lo encontrado por NANDA, y col., (1975) con Lablab atropurpureus, que el pH óptimo no es 11. - En el caso que nos ocupa, Pisum sativum, L., no dió diferencias significativas entre los rendimientos (% E), referidos a nitrógeno total, cuando la solución solubilizante fué sometida a los pH natural 9,0 y 11,0. Si resultó, en cambio menos eficiente la extracción a pH 7,0.

32.- En cuanto a los rendimientos (% E referido a nitrógeno total), alcanzados en estas pruebas preliminares, están de acuerdo con los obtenidos por NANDA y col. si los comparamos con la especie más próxima (Vigna sinensis) y en la fase de su ciclo más cercana a la nuestra (floración, ya que en periodo de fructificación no lo estudia). Mientras dichos investigadores, en el caso citado, obtuvieron un coeficiente de extracción del 65 %, con Pisum sativum obtuvimos un 58 %. Tenemos que hacer la observación de que mientras que aquellos trabajaron a dilución de 45 g de sustancia seca por kg de zumo, nosotros lo hicimos con 90 g de S.S./kg. Además de esto y del factor específico, indudablemente ha debido influir la edad de la planta, ya que, como señalan NANDA y col. (1975) la proporción del nitrógeno extraíble decrece con la edad.

42.- De todo ello deducimos que, en nuestro caso particular, el pH más idóneo a que debe someterse la solución extractante es --

Tabla 19.- COEFICIENTES DE EXTRACCION DEL NITROGENO TOTAL EN EL -
FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L.

(en %)

	Valores de pH ajustados al material triturado(1)				
	4,5	natural = 5,8	7,0	9,0	11,0
Zumo 1ª. fase	31,68	47,57	36,05	46,88	45,92
Zumo 2ª. fase	9,07	10,31	12,33	9,55	11,82
Extraído en el <u>pro</u> ceso completo	40,75	57,88	48,38	56,43	57,74
Retenido en el <u>re</u> síduo fibroso	42,44	40,75	50,51	41,26	42,43

(1): Dilución empleada: 90 g de S.S./kg de solución.

el natural puesto que la eficacia de extracción del nitrógeno total no se eleva con la alcalinidad y el empleo de dicho pH supone un -- ahorro en las operaciones de extracción.

3.2.2.1.2.- Rendimiento en sustancia seca. Como puede verse en las tablas 9, 10 y 20 el total de los zumos obtenidos durante las -- dos fases del proceso de extracción dió un rendimiento medio de -- 1030,09 kg ha⁻¹ de sustancia seca. Dicho total se reparte de la si guiente forma: el zumo extraído durante la primera y segunda fase -- de los fraccionamientos fué de 808,44 kg ha⁻¹ y 221,65 kg ha⁻¹ como promedios, respectivamente. Teniendo en cuenta el rendimiento en ma teria seca ha⁻¹ de la planta desgranada ello supone que el coefi- -- ciente de extracción, medido en sustancia seca fué de 29 % y duran te la primera fase y durante la segunda de casi un 8 %. Dicho coefi ciente para el proceso completo resultó por consiguientes próximo a un 37 %.

El coeficiente de extracción de materia seca depende, no so lo de la complejidad del número de etapas de extracción sucesivas a que se somete la planta, NANDA y col. (1975), y del equipo utilizado -- para ello, sino también de las características del material inicial sometido al proceso, como se desprende del trabajo de CROOK y HOLDEN (1948).

El valor obtenido en nuestro caso parece bastante favorable -- ya que las cifras citadas por otros autores se encuadran generalmen ta entre el 20 y el 50 %. Así RIVADULLA GRACIA (1978) en alfalfa -- extrajo aproximadamente un 22 %.

Finalmente hacemos la observación de que este dato (37 %) es- tá en concordancia con el 60 % que permanece en el residuo fibroso.

El 3 % de materia seca de la planta desgranada que no se recupera' en ninguna de las dos fracciones, se pierde durante el procesamiento.

3.2.2.2.- PARTICION DEL NITROGENO EN LA SUBSTANCIA SECA.

Igual que en el residuo fibroso en el zumo de la primera - fase se valoraron el N total, el N extraíble con alcohol y el N de péptidos, y se calcularon los tantos por ciento de cada uno de los dos últimos respecto al primero, el N no protéico, el tanto por -- ciento del N no protéico respecto del N total y el N protéico. En el zumo obtenido durante la segunda fase solamente se analizó el N total. Los resultados se expresan en las tablas 11 y 21.

3.2.2.2.1.- El promedio de nitrógeno total en el zumo de la primera fase supuso un 3,58 % de la substancia seca y en el de la segunda fase 3,55 %. Estos valores son un 30 % y un 29 % más elevados que en la cosecha inicial.

La proporción de N total en el zumo es inferior a los valores hallados por CHEESEMAM (1974) que estudió la variación estacional de la composición de los zumos de Medicago sativa y Lolium sp., durante los años 1973, 74 y 75. Las oscilaciones fueron de 4,8-6,7 % y 3,8-7,3 % del N total en la substancia seca, respectivamente. Los trabajos de este autor fueron recogidos con ocasión del 9º -- Symposium de la Sociedad Británica de Pastos (CHEESEMAM, 1977).

Teniendo en cuenta la substancia seca extraída en cada uno de los dos zumos y las referidas proporciones de N total, los coeficientes de extracción, medidos en nitrógeno total (tabla 20) fue

ron de 38,91 % para el zumo de la primera fase y 10,42 % para el de la segunda. Por lo tanto, el coeficiente de extracción, medido en nitrógeno total, para la totalidad del proceso fué de 49,33 %, como promedio de los doce fraccionamientos efectuados. Este valor está de acuerdo con el retenido en el residuo fibroso, ya citado, de 51,09 %.

El coeficiente de extracción, medido en N total, ya referido (49,33 %) resultó comparable con los hallados por JOSHI (1971) para subproductos constituidos por hojas de tomate, zanahoria, rábano y remolacha que fueron 54 %, 35,7 %, 53,7 % y 52,5 % respectivamente y que para él resultaron prometedores.

Según CROOK y HOLDEN (1948), la extracción del material nitrógeno depende esencialmente de la proporción de nitrógeno que contiene la planta inicial, incrementando cuando esta aumenta. Considerando todas las especies estudiadas por él, el coeficiente de extracción, medido en N total, va desde 48 % para hojas que contienen un 2 % de nitrógeno en substancia seca, a 86 % para aquellas que contienen un 6 % de nitrógeno en substancia seca. Estos autores también indican que la extracción de nitrógeno está también influida por la proporción de materia seca de la planta, ya que las hojas que tienen mayor proporción de agua contienen también más nitrógeno.

Como ya hemos indicado anteriormente otro factor que influye decisivamente es la edad de la planta. Ello puede deberse a dos causas: a) a la caída en la proporción de N al avanzar en el ciclo de crecimiento y desarrollo (FAUCONEAU, 1960; TREVIÑO y col., 1978) y b) la mayor cantidad de materia seca que contiene la planta madura.

Pero además de estas dos causas deben influir otras que se analizarán al valorar el rendimiento del concentrado protéico. Así lo demostró FENSTENSTEIN (1961) con dos lotes de hojas de tabaco que tenían proporciones comparables de substancia seca y nitrógeno, - uno de ellos estaba constituido por hojas jóvenes y el otro por - viejas; los coeficientes de extracción en materia seca y nitrógeno total descendieron de 68 % y 86 % a 43 % y 38 %, respectivamente y mientras en el primer lote se obtenía un zumo verde opaco de pH = 6, en el segundo era marrón transparente y de pH = 5,4.

Tenemos que hacer la observación de que este coeficiente de extracción resultó casi un 9 % inferior que en los ensayos de búsqueda del pH más idóneo. Pensamos que puede ser debido por una parte al manejo de 10 veces más de material en los fraccionamientos y por otro, a que en este caso el tiempo de conservación en cámara fué prolongado en tanto que las pruebas de pH se realizaron a los pocos días de recolectar la cosecha.

3.2.2.2.2.- La proporción de nitrógeno extraíble con alcohol al 80 % fué de 1,58 % en la substancia seca, que representa un - 43,01 % del N total en el zumo obtenido en la primera etapa.

Ello supone que en este zumo se extrae un 59,45 % del N extraíble con alcohol al 80 % que poseía la planta desgranada.

3.2.2.2.3.- El nitrógeno de péptidos en la substancia seca y el porcentaje que representa del nitrógeno total fueron 0,66 % y 18,38 %, respectivamente en el zumo obtenido en la primera etapa.

Por lo tanto, un 50,28 % del nitrógeno de péptidos que contenía la planta desgranada y triturada de Pisum sativum inicialmente

Tabla 20.- COEFICIENTES DE EXTRACCION DE LA SUBSTANCIA SECA, NITROGENO TOTAL Y NITROGENO -
PROTEICO DE LOS ZUMOS DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE Pisum sa-
tivum, L.

Fracciona- miento. nº	Substancia seca			(en %)			Nitrogeno total		Nitrogeno proteico.
	1ª fase	2ª fase	Total	1ª fase	2ª fase	Total	1ª fase	2ª fase	
1	29,94	8,24	38,18	42,74	11,13	53,87	27,20		
2	32,59	7,78	40,37	43,65	10,36	54,01	29,28		
3	33,47	8,99	42,46	43,56	11,42	54,98	26,11		
4	26,12	7,82	33,94	35,15	11,40	46,55	21,07		
5	25,46	7,24	32,70	32,95	9,28	42,23	18,59		
6	27,65	10,93	38,58	33,43	14,55	47,98	22,14		
7	29,54	6,65	36,19	40,58	11,19	51,77	-		
8	27,68	7,42	35,10	38,18	8,34	46,52	27,85		
9	31,33	9,01	40,34	40,32	10,84	51,16	27,63		
10	29,10	5,98	35,08	38,06	7,08	45,14	23,36		
11	25,54	7,88	33,42	26,82(*)	8,44(*)	35,26(*)	16,13(*)		
12	29,36	7,41	36,77	39,40	9,03	48,43	-		
\bar{x}	28,98	7,94	36,93	38,91	10,42	49,23	24,8		
σ n-1	2,63	1,27	3,09	3,80	1,97	4,12	3,65		
C.V.	9,07	15,99	8,37	9,77	18,90	8,35	14,70		

(*) Para los cálculos no se han considerado estos valores porque su correspondiente de la
planta desgranada estaba fuera de los márgenes de confianza.

Tabla 21.- PARTICION DEL NITROGENO DE LOS ZUMOS DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA
DE *Pisum sativum*, L.

(an % de la substancia seca)								
Fracciona- miento. na.	ZUMO DE LA PRIMERA FASE				ZUMO DE LA 2ª FASE			
	Nitrógeno total (t)	N extraíble con alcohol al 80 % (a)	% de (a) respecto a (t)	N de póp- tidos (b)	% de (b) respecto a (t)	N no-pro- téico. (c)	% de (a)+(b) respecto a (t)	Nitrógeno total (t)
1	3,94	1,57	39,97	0,84	21,31	2,41	61,28	3,73
2	3,67	1,48	40,32	0,78	21,25	2,25	61,57	3,65
3	3,28	1,50	45,73	0,58	17,68	2,08	63,41	3,20
4	3,93	1,56	39,69	0,86	21,88	2,42	61,57	4,26
5	3,30	1,50	45,45	0,69	20,90	2,19	66,35	3,27
6	3,18	1,43	44,96	0,50	15,72	1,93	60,68	3,50
7	3,71	-	-	-	-	-	-	4,54
8	3,89	1,75	44,98	0,62	15,93	2,37	60,91	3,17
9	3,79	1,55	40,89	0,82	21,63	2,37	62,53	3,61
10	3,57	1,61	45,10	0,71	19,89	2,32	64,99	3,23
11	3,14	1,87	59,55(x)	0,24	7,64	2,11	67,19	3,20
12	3,57	-	-	-	-	-	-	3,24
\bar{x}	3,58	1,58	43,01	0,66	18,38	2,25	63,05	3,55
σ n-1	0,29	0,13	2,67	0,19	4,44	0,16	2,35	0,45
C.V.	8,10	8,23	6,21	28,78	24,15	7,11	3,72	12,68

Para los cálculos estadísticos se preecindió de (x) por estar fuera de los márgenes de confianza.

te, es extraído en la primera etapa del proceso.

3.2.2.2.4.- A partir de los datos anteriores, deducimos que el nitrógeno no protéico del zumo de la primera fase supone un 2,25 % de la substancia seca y un 63,05 % del nitrógeno total.

Ello quiere decir que el 56,70 % del nitrógeno no protéico, que contenía la planta desgranada de P. sativum inicialmente, fué extraído en esta fracción.

La proporción de N no protéico ya referido de 2,25 %, está en línea con los determinados por CHEESEMAM en el trabajo mencionado antes, que oscilaron entre 1,2 y 2,2 % en Medicago sativa y 0,7 y 2,3 % en Lolium sp.

3.2.2.2.5.- La proporción de nitrógeno protéico en la substancia seca del mencionado zumo resultó por lo tanto 1,33 % y un -- 37,15 % del nitrógeno total, lo que significa, teniendo en cuenta la materia seca extraída en esta fracción que el coeficiente de extracción, medido en nitrógeno protéico, fué de 24,8 % en este zumo (tabla 20).

De los resultados anteriores deducimos que la relación: nitrógeno protéico extraído/nitrógeno total extraído, expresado en porcentaje, supone de media un 36,95 %. Este índice es considerablemente inferior a los obtenidos por NANDA y col., (1975), quienes para Vigna sinensis en floración determinaron un 59,1 %. No obstante, dichos autores señalan que el citado índice incrementa con la edad hasta el comienzo de la floración, pero que una vez ésta ha comenzado, disminuye. Además puede explicar también nues-

tro resultado el hecho de haber utilizado plantas conservadas en cámare frigorífica mientras en los experimentos de NANDA eran recién recolectados, ya que según señala PIRIE (1971) algunas proteínas coagulan al congelarse por lo que resultarán retenidas más fácilmente entre la fibra, así como que la mencionada proporción (nitrógeno protéico/nitrógeno total) en el vegetal inicial era baja.

3.2.2.3.- USOS ALTERNATIVOS DEL ZUMO.

Como no entra en nuestros proósitos una alternativa de la utilización del fraccionamiento como es la de detener el proceso en esta fase y emplear el zumo directamente en la alimentación del ganado, no realizamos análisis ni valoración nutritiva del mismo (aunque esta composición podría deducirse de la de los productos finales que obtuvimos por el fraccionamiento y de la proporción de agua o grado de dilución con que operamos). Sin embargo, sí conviene señalar que este empleo directo puede encontrarse justificado sobre todo cuando las fases ulteriores, que se sintetizan en la --table 22, JONES (1977), resulten muy costosas y no guarden relación con la calidad del producto final.

De los ensayos verificados por CHEESEMAM (1977) merecen destacarse los siguientes datos de composición del zumo: la sustancia seca varía entre el 7,2 y el 14,1 % para Medicago sativa y entre el 8,5-12,1 % en Lolium sp., la proteína bruta osciló entre --30-42 % y 24-46 %; los carbohidratos solubles en agua entre 10,0-20,2 % y 13,7-46,7 % respectivamente. Resultaron similares en ambas especies las proporciones de cenizas 14-16 % y grasa 2,0-3,5 %.

Dicho zumo bien puede deshidratarse o bien utilizarse en forma líquida, lo que presenta problemas de conservación. Los tratamientos para la conservación ensayados por este mismo autor fueron: calor (inyección de vapor a presión hasta alcanzar 85°C), pH 3,0 y 4,5 (adicionando CLH concentrado), formalina (0,1 y 0,2 % - V/V) y metabisulfito sódico (adicionado en la proporción 1,4 g/l), solo o en combinación con los otros tratamientos. Obtuvo la conclusión de que para un almacenamiento largo lo más recomendable resulta un pH bajo 3,0 \pm 0,2 junto con la edición de metabisulfito. Se ha ensayado también la adición de otros ácidos: fórmico, propiónico, etc. encontrándose más activos el clorhídrico y fórmico que el propiónico en el control de hongos y bacterias.

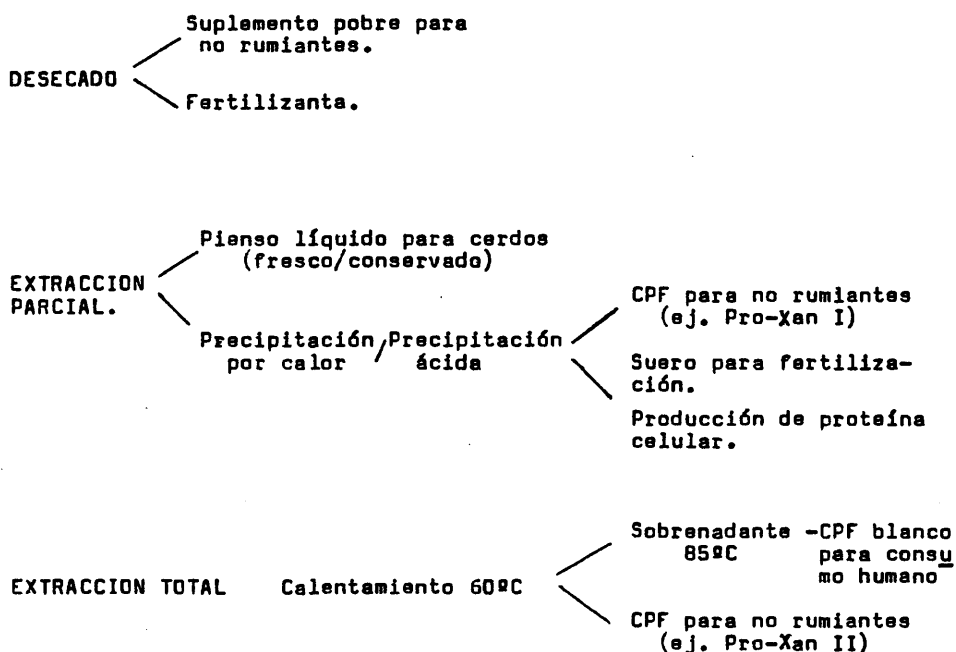
El empleo directo del zumo en la alimentación de cerdos ha sido estudiado en Gran Bretaña por investigadores del National Institute for Research in Dairying y del Rowet Research Institute y sus trabajos se han sintetizado en el libro editado por WILKINS (1977) con ocasión del 9º Simposium de la Sociedad Británica de Pastos. Entre los primeros destacan los de BARBER y col., y BRAVDE que utilizaron zumo de Medicago sativa en cardos en crecimiento y entre los segundos JONES y HOUSEMAN que estudiaron especialmente zumo de gramíneas.

De los resultados obtenidos por todos ellos podemos resumir que ambos zumos pueden reemplazar satisfactoriamente la mitad del suplemento protéico (harina de pescado o de soja) en dietas para cerdos en crecimiento. La sustitución total puede producir dificultades en cerdos menores de 3 meses pero no en mayores. No se observaron alteraciones por cambios frecuentes de dietas conte

niendo o no zumo. En algún caso pueden presentarse problemas que se podrían asociar a la composición mineral de las dietas de harina + zumo y/o a la ingestión de agua.

Figura 7.- PROCESOS ALTERNATIVOS EN EL USO DEL ZUMO VEGETAL.

Proceso



JONES, A.S., 1977.- The principles of green crop fractionation. In Green Crop Fractionation, WILKINS, R.J.(Ed.). Occasional Symposium No. 9. British Grassland Society. 1977, p. 2.

3.2.3.- CONCENTRADO PROTEICO.

3.2.3.1.- RENDIMIENTOS.

3.2.3.1.1.- Substancia seca: Según se expone en la tabla 9 los rendimientos medios de concentrado protéico de la primera y segunda fases del proceso de extracción fueron $86,75 \text{ kg ha}^{-1}$, y $21,92 \text{ kg ha}^{-1}$ respectivamente. Esto supone un rendimiento total medio de $108,67 \text{ kg ha}^{-1}$, habiéndose extraído (coeficiente de extracción) un $3,90 \%$ (correspondiendo un $3,11 \%$ a la primera fase y el otro $0,79 \%$ a la segunda fase) de la substancia seca inicial (tabla 22) o $1,32 \%$, de la materia verde de la planta desgranada de Pisum sativum, ($1,05 \%$ durante la primera etapa del proceso de extracción y el $0,27 \%$ restante durante la segunda). RIVADULLA GRACIA (1978) señala un rendimiento del $2,3 \%$ en alfalfa, mientras BRAY (1973) y KOHLER y BICKOFF (1974) indican valores del 3% y $2,6 \%$ respectivamente, empleando el procedimiento PRO-XAN en alfalfa.

El coeficiente de separación, en materia seca (es decir - la proporción de substancia seca del concentrado referido a la del zumo del cual procede) alcanzó el $10,51 \%$ considerando el conjunto del proceso de extracción, si bien en la primera etapa fué de $10,55 \%$ y en la segunda un poco más bajo $10,03 \%$ (tabla 23).

3.2.3.1.2.- Proteína bruta: suele ser frecuente expresar los rendimientos de concentrado protéico en forma de proteína bruta (N Kjeldahl $\times 6,25$) por hectárea. Teniendo en cuenta que en los análisis del CPF efectuados obtuvimos un $37,75 \%$ de proteína bruta en la substancia seca, durante la primera fase se obtuvieron $32,75 \text{ kg}$

de proteína bruta ha^{-1} y en la segunda 8,22. El proceso completo -- rindió, por lo tanto, un 40,97 kg de proteína bruta ha^{-1} , en forma de CPF.

Según se desprende de los numerosos trabajos realizados, los rendimientos en proteína del concentrado protéico dependen no solo del sistema de fraccionamiento, al que hicimos alusión al valorar el rendimiento del zumo, sino también del manejo del cultivo --que puede orientarse a conseguir un alto rendimiento de proteína por hectárea-- y de factores intrínsecos del cultivo que afectan a la proporción en que dicha proteína se extrae en forma de CPF.

Respecto a los primeros, son perfectamente conocidas las características taxonómicas, morfológicas y fisiológicas que determinan las variaciones en la proporción de proteína de las plantas. Consiguientemente la elección de las especies y el momento de la siega para maximizar los rendimientos de proteína son datos que habrá que decidir en cada caso.

Fijada la especie es bien sabido, y no parece necesario -- recurrir a los innúmeros trabajos que lo demuestran, que la proporción de proteína disminuye con la edad, que es mayor cuanto mayor sea la relación hojas/tallos y que la proporción de nitrógeno del suelo y la fertilización equilibrada pueden incrementar la fracción de nitrógeno de la planta en un determinado momento. En el caso de las no-leguminosas es bien sabido también que la aplicación de fertilizantes nitrogenados ocasiona un incremento en la proporción de proteína hasta alcanzar un determinado límite dependiente de la especie y momento de su ciclo y otra serie de interacciones que no son del caso señalar.

Los rendimientos obtenidos conmutamente, con otras especies cultivadas como forrajeras oscilan entre los 1000 y 5000 kg ha⁻¹ y año. Y así: alfalfa (Medicago sativa, L.) y trébol blanco (Trifolium repens, L.), 1100 y 1500 kg de proteína ha⁻¹ (McKENZIE, 1977); Medicago sativa, L. 1950 kg ha⁻¹ (ALLISON y VARTHA, 1973), más de 3000 kg ha⁻¹ fertilizada con NPK (JOSHI, 1971); Vigna unguiculata 895 kg ha⁻¹ en 80 días (DEV y col., 1974; DESHMUKH y col., 1974); Triticum aestivum seguido de dos cosechas de Sinapis alba o Raphanus sativus, 2000 kg ha⁻¹; Dactylis glomerata 1670 kg ha⁻¹ (ARKCOLL y FESTENSTEIN, 1971). En zonas tropicales húmedas pueden llegar a alcanzarse rendimientos entre 3000 y 5000 kg de proteína ha⁻¹ año⁻¹ dependiendo del cultivo.

Referente a los segundos -los factores fitológicos- HEATH y col., (1977) señalan que los principales factores intrínsecos de los vegetales que afectan a la eficiencia de la extracción son: la proporción de agua por una parte y la de fibra neutro-detergente - por unidad de agua de la cosecha, por otra. HEATH (1977), incluye además las proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de modo que con ellos, los carbohidratos solubles el pH y el N protéico se puede prever mediante la siguiente ecuación el coeficiente de extracción de la proteína verdadera: $PE \times R = a_0 + a_1 \text{ celulosa} + a_2 \text{ hemicelulosa} + a_3 \text{ lignina} + a_4 \text{ carbohidratos solubles} + a_5 \text{ pH} + a_6 \text{ nitrógeno protéico}$.

$PE \times R$ = coeficiente de extracción de proteína verdadera.

(Todos los factores se expresan por unidad de agua de la cosecha, excepto el pH, que fué expresado por unidad de peso fresco).

Estos autores llegan a la conclusión de que existe una elevada correlación entre PE x R y substancia seca y PE x R y el modelo total, pero peor entre PE x R y FND. En nuestro caso, el coeficiente de correlación entre la proporción de substancia seca de la planta desgranada de P. sativum y el coeficiente de extracción de N protéico del CPF fué de -0,70.

En los subproductos, todas las variables referentes al manejo del cultivo están prefijadas para el rendimiento de la cosecha principal y no puede incidirse por tanto en ellas. La eficiencia de la extracción dependerá pues principalmente de la composición del subproducto. Teniendo en cuenta estos hechos y que la extracción de la proteína supone un rendimiento adicional, es de esperar y así lo confirman los escasos datos reseñados en la bibliografía, que los rendimientos alcanzados sean muy inferiores y en ningún modo comparables a los anteriormente citados. Así: Arachis hypogaea var. viz. TMV-2 y var. SB-II dieron 34 y 36 kg de proteína ha⁻¹; Raphanus sativus, 271 kg ha⁻¹; Beta vulgaris 87 kg ha⁻¹; Brassica oleracea 84, 120 y 124 kg ha⁻¹ a los 50, 69 y 70 días respectivamente; Cicer arietinum 69 kg ha⁻¹ y Carthamus tinctorius 84 kg ha⁻¹ (JOSHI, 1971).

Por consiguiente el rendimiento obtenido del subproducto que nos ocupa de Pisum sativum (40,96 kg ha⁻¹) es semejante al de los citados por JOSHI en otras especies de Papilionaceas. Queremos hacer observar que, a la vista del modelo de regresión múltiple propuesto por HEATH y col., (1977), las condiciones para obtener coeficientes de extracción elevados son particularmente desfavorables puesto que el subproducto del guisante procede de un cultivo que

casí ha completado su ciclo de desarrollo. También queremos resaltar que en nuestro estudio hemos incidido sobre los dos únicos factores posibles (humedad y pH), señalados por los mismos autores en el modelo citado, a fin de conseguir una extracción más eficiente de la proteína.

3.2.3.2.- PARTICIÓN DEL NITRÓGENO EN LA SUBSTANCIA SECA.

En el concentrado protéico obtenido en la primera fase del proceso de extracción se llevaron a cabo los mismos análisis que en el residuo fibroso, es decir: nitrógeno total, nitrógeno extraíble con alcohol al 80 %, nitrógeno de péptidos y se calcularon las proporciones de los dos últimos respecto al primero, el nitrógeno no-protéico y el nitrógeno protéico. En el concentrado obtenido en la segunda fase se analizó el nitrógeno total, para valorar los rendimientos del proceso completo de extracción. Los resultados se indican en las tablas 10, 11, 22, 23 y 24.

3.2.3.2.1.- El promedio de nitrógeno total en el concentrado -- de la primera fase fué 6,22 % de la sustancia seca y en el de la segunda fase 5,93 %. Estos valores--como cabía esperar después de -- lo expuesto (se trata de un subproducto de una planta que alcanzó la fase final de su ciclo vegetativo)--son inferiores a los hallados por GONZALEZ y col., (1974) para alfalfa (Medicago sativa, L.) y veza velluda (Vicia villosa Roth) y que oscilaron entre un 7,58% para el concentrado de veza precipitado a pH = 4,00 y un 9,07 % para el de alfalfa Aragón obtenido a pH natural.

Consiguientemente, de acuerdo con estos datos de composi-

ción y los rendimientos en substancia seca de ambos concentrados, la proporción de nitrógeno total extraído en forma de concentrado (coeficiente de extracción, medido en nitrógeno total) alcanzó el 9,19 % del nitrógeno total que contenía la substancia seca inicial (7,39 % en la primera fase y 1,80 % en la segunda); tabla 22.

El coeficiente de separación, medido en nitrógeno total, resultó (tabla 23) 18,18 % para el proceso de extracción completo, si bien el de la primera fase fué un poco más elevado que el de la segunda (18,67 % y 17,00 % respectivamente).

3.2.3.2.2.- La proporción de nitrógeno extraíble con alcohol -- al 80 % fué de 0,439 % de la substancia seca, que representa un 7,06 % del nitrógeno total en el CPF obtenido en la primera fase (tabla 24).

Esto representaba un 1,77 % del nitrógeno extraíble con alcohol que poseía la planta desgranada.

3.2.3.2.3.- El nitrógeno de péptidos representó solamente un 0,06 % de la substancia seca y un 0,97 % del nitrógeno total en el concentrado protéico resultante de la primera etapa del proceso de extracción.

Por lo tanto, sólo un 0,47 % del nitrógeno de péptidos que contenía la planta desgranada de Pisum sativum inicialmente, es recuperado en forma de CPF durante esta primera etapa.

3.2.3.2.4.- De la suma de los dos anteriores se deduce que el nitrógeno no protéico representa un 0,49 % de la substancia seca y un 7,93 % del nitrógeno total en el CPF de la primera fase.

Tabla 22.- COEFICIENTES DE EXTRACCION DE LOS CPFs DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRA-

NADA DE *Pisum sativum*, L.

(en %).

Fracciones miento ng.	Substancia seca			Nitrógeno total			Nitrógeno protéico		Nitrógeno protéico extraído/ Nitrógeno total extraído	
	1a fase	2a fase	Total	1a fase	2a fase	Total	1a fase	1a fase	1a fase	1a fase
1	3,60	1,06	4,66	8,49	2,36	10,86	12,88	38,75	38,75	38,75
2	3,74	1,03	4,77	8,73	2,28	11,01	14,03	38,45	38,45	38,45
3	3,68	1,01	4,69	9,46	2,76	12,23	14,26	36,63	36,63	36,63
4	3,67	0,82	4,49	8,85	1,91	10,76	12,83	38,40	38,40	38,40
5	2,50	0,64	3,14	6,08	1,50	7,58	9,32	33,63	33,63	33,63
6	3,01	0,80	3,82	6,76	1,76	8,52	10,64	39,29	39,29	39,29
7	2,74	0,60	3,35	6,29	1,29	7,58	11,17	-	-	-
8	2,74	0,67	3,42	5,86	1,33	7,20	10,09	39,07	39,07	39,07
9	3,47	0,75	4,22	7,23	1,45	8,68	12,17	37,46	37,46	37,46
10	3,17	0,81	3,98	6,92	1,68	8,64	10,23	35,07	35,07	35,07
11	2,05	0,52	2,56	3,97(*)	0,90(*)	4,87(*)	6,53(*)	32,80	32,80	32,80
12	2,95	0,72	3,68	6,55	1,47	8,02	10,07	-	-	-
\bar{x}	3,11	0,79	3,90	7,39	1,80	9,19	11,61	36,95	36,95	36,95
σ_{n-1}	0,54	0,17	0,70	1,26	0,48	1,71	1,71	2,35	2,35	2,35
C.V.	17,36	21,52	17,95	17,05	26,67	18,61	14,73	6,36	6,36	6,36

(*) No se han tenido en cuenta estos valores en los cálculos porque su correspondiente en la planta desgranada estaba fuera de los márgenes de confianza.

Tabla 23.- COEFICIENTES DE SEPARACION DE LOS CPFs DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA
DE *Pisum sativum*, L.

98

Fraccionamiento nº	Substancia seca			(en %)			Nitrogeno total			Nitrogeno protéico
	1ª fase	2ª fase	Total	1ª fase	2ª fase	Total	1ª fase	2ª fase	Total	1ª fase
1	12,02	12,88	12,21	19,88	21,24	20,16	47,34			
2	11,47	13,24	11,81	20,01	22,01	20,39	47,89			
3	11,00	11,19	11,04	21,73	24,18	22,24	54,62			
4	14,04	10,48	13,22	25,18	16,72	23,11	60,86			
5	9,84	8,83	9,61	18,46	16,16	17,96	50,14			
6	10,90	7,35	9,90	20,23	12,07	17,76	48,04			
7	9,28	9,06	9,24	15,49	11,58	14,64	-			
8	9,90	9,11	9,73	15,46	16,01	15,47	36,23			
9	10,87	8,33	10,31	17,93	13,37	16,96	44,07			
10	9,18	13,52	11,34	18,30	23,68	19,14	43,80			
11	8,02	6,59	7,67	14,79	10,67	13,80	41,09			
12	10,06	9,78	10,00	16,63	16,32	16,57	-			
\bar{x}	10,55	10,03	10,51	18,67	17,00	18,18	47,41			
σ_{n-1}	1,56	2,29	1,50	2,98	4,75	2,92	6,91			
C.V.	14,79	22,83	14,27	15,96	27,94	16,06	14,57			

Tabla 24.- PARTICION DEL NITROGENO EN LOS CPFs DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA.

DE *Pisum sativum*, L.

Fraccionamiento número	CPF DE LA PRIMERA FASE							CPF DE LA 2ª FASE	
	Nitrógeno total(t)	N extraíble al 80% (a)	% de (a) respecto a (t)	N de pép- tidos (b)	% de (b) respecto a (t)	Nitrógeno no protéico co.	% (a)+(b) respecto a (t)	N Protéico	Nitrógeno total (t')
1	6,52	0,480	7,36	0,03	0,46	0,510	7,82	6,01	6,15
2	6,40	0,470	7,34	0,04	0,62	0,510	7,96	5,89	6,07
3	6,48	0,435	6,71	0,08	1,13	0,515	7,84	5,96	6,91
4	7,05	0,415	5,88	0,09	1,27	0,505	7,15	6,54	6,80
5	6,19	0,445	7,19	0,09	1,45	0,535	8,64	5,65	5,99
6	5,90	0,370	6,27	0,02	0,42	0,390	6,69	5,51	5,74
7	6,19	0,430	6,94	0,02	0,32	0,450	7,26	5,74	5,81
8	6,03	0,450	7,54	0,02	0,41	0,470	7,95	5,56	5,59
9	6,25	0,475	7,60	0,02	0,32	0,495	7,92	5,75	5,81
10	6,00	0,845(x)	14,08(x)	0,12	2,00	0,965(x)	16,08(x)	5,03(x)	5,66
11	5,79	0,420	7,25	0,09	1,55	0,510	8,80	5,28	5,21
12	5,90	0,445	7,54	0,10	1,69	0,545	9,23	5,35	5,41
\bar{x}	6,22	0,439	7,06	0,06	0,97	0,49	7,93	5,75	5,93
$\sqrt{n-1}$	0,35	0,03	0,56	0,038	0,61	0,04	0,71	0,35	0,51
C.V.	5,63	6,83	7,93	63,33	62,89	8,16	8,95	6,09	8,60

Para la determinación de \bar{x} , $\sqrt{n-1}$ y C.V. no se han tenido en cuenta los valores (x) por estar fuera de los márgenes de confianza.

Consiguientemente solo un 1,31 % del nitrógeno no protéico que poseía la planta desgranada de Pisum sativum es retenido en -- el concentrado protéico obtenido en la primera fase, a pesar de la elevada proporción que fué extraída en el zumo correspondiente -- (56,70 %) ya que, como era de esperar, queda casi en su totalidad en el suero.

3.2.3.2.5.- La proporción de nitrógeno protéico en la sustancia seca del mencionado concentrado resultó por tanto 5,75 % de -- la sustancia seca, y 92,12 % del nitrógeno total de dicho concentrado protéico.

Por lo tanto un 11,61 % del nitrógeno protéico que poseía la planta desgranada antes de ser sometida al fraccionamiento, se recupera en el concentrado protéico obtenido en la primera fase.

El coeficiente de separación, medido en nitrógeno protéico, fué para la primera fase de un 47,41 %.

Se trata por consiguiente de un producto en cuya fracción -- nitrogenada predomina muy acusadamente el nitrógeno protéico (92,12 % del N total), dato de especial significación y valor para la -- alimentación de los animales monogástricos y el hombre.

3.2.3.3.- COMPOSICION QUIMICO-BROMATOLOGICA.

Dado que esta fracción es cualitativamente la más importante del fraccionamiento, en el concentrado protéico de la primera fase, se realizaron los siguientes análisis: proteína bruta, extracto etéreo y cenizas brutas (partición de WEENDEE), fibra neutro-detergente, fibra ácido-detergente y hemicelulosas (partición

de VAN SOEST). Se determinaron también los siguientes minerales:Ca, P, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn. Así como los aminoácidos. Los resultados se detallan en las tablas 26, 27 y 28.

3.2.3.3.1.- Los análisis de proteína bruta del CPF obtenido durante la primera etapa del proceso de extracción dieron un 37,75 % de la sustancia. La proteína verdadera (N protéico x 6,25) fué, -- como es natural, un poco inferior 35,62 % de la sustancia seca, -- pues como es bien sabido, el nitrógeno Kjeldahl -- que es el que se de termina para calcular la proteína bruta -- incluye, además del nitrógeno protéico, todo el N en forma amoniacal.

GERLOFF y col. (1965) obtuvieron en muchas muestras de CPF -- alrededor del 55 % de proteína bruta. Cuando una muestra contiene una cantidad inferior a esta afirman que ello se debe probablemente a la contaminación de la cosecha con suelo en la recolección con el consiguiente aumento en la proporción de cenizas. No obstante, en la bibliografía pueden constatarese resultados muy diversos; y así WALTER y col., (1978) obtuvieron mediante coagulación a 83°C y posterior centrifugación un concentrado en batata con 36 % de proteína, CHOV y col., (1977) 41, 2 %, 41,1 %, 38,6 %, 38 % y 28, 4 % en concentrados protéicos foliares de Centrosoma pubescens, Desmodium intortum, Pueraria phaseoloids, Pueraria thunbergiana y Stylosanthes guyanensis, respectivamente.

3.2.3.3.2.- El concentrado protéico obtenido a partir de la planta desgranada de Pisum sativum es rico en extracto etéreo, ya que -- dió una proporción media de 13,59 % de la sustancia seca, en los -- doce fraccionamientos realizados. Dicha proporción es elevada si la

comparamos con la de concentrados protéicos de alfalfa obtenidos -- por diferentes autores en procesos industriales (tabla 25). En la -- revisión realizada por MORRIS (1977) con ocasión del IX Symposium -- de la Sociedad Británica de Pastos, aparece que los CPF, contienen entre 22-29 % de lípidos totales, estimados por extracción con cloroformo: metanol caliente (BUCHANAM, 1969a; BYERS, 1971). El valor -- muy inferior hallado por nosotros se justifica por el hecho de que las extracciones con éter dan estimaciones que representan a veces menos de la mitad de los lípidos totales (HUDSON y KARIS, 1973); -- así, por ejemplo, los extractos estéreos no incluyen los fosfolípi-- dos.

Según estos últimos autores los lípidos de los CPF son componentes estructurales de las células y los principales componentes -- son galactosil-diglicéridos, no triglicéridos; también señalan que la proporción de lípidos totales en la sustancia seca de la planta desciende con la edad, así en el ray grass inmaduro alcanza el 16 %, mientras en el maduro el 9,5 %. El descenso es similar en las principales clases de lípidos presentes en las hojas (monogalactosil y digalactosil-diglicéridos, sulfolípidos y fosfolípidos).

La composición en ácidos grasos esenciales del extracto lípido fué estudiada por HUDSON y KARIS (1973, 1976) quienes señalan que el 10 % del total de ácidos grasos estaba constituido por linoléico y el 60 % por linolénico, la proporción de este último decrece con la madurez (66-49 %) mientras que la del palmítico aumenta -- (13-24 %). LIMA y col., (1965) dieron resultados promedios similares, pero indican una amplia fluctuación en distintas especies. Los últimos autores citados indican que la proporción total de ácidos grasos

puede variar entre el 2,5 y el 8,4 % de la substancia seca.

3.2.3.3.3.- Como era de esperar, es casi nula la presencia de fibra en el CPF, que solo aparece con carácter residual. Así la media en los doce fraccionamientos realizados, fué para la fibra neutro-detergente de 1,79 % de la substancia seca y para la fibra ácido-detergente 0,81 % de la substancia seca. Por lo tanto las hemicelulosas supusieron un 0,99 % de la substancia seca.

3.2.3.3.4.- La proporción de cenizas brutas fué de 10,57 % de la substancia seca, valor que se encuentra comunmente en los vegetales completos, aunque SUBBA RAU y col. (1972) encontraron en muestras de CPF de remolacha y zanahoria un 16 y un 37 % de cenizas, debido a la contaminación de la cosecha con el suelo. En este caso las finas partículas minerales quedan suspendidas en el zumo y son precipitadas con el material cloropástico, contaminando el CPF, un valor más típico, estaría comprendido entre 6-8 % de cenizas totales.

En términos generales la proporción de cenizas en el producto final depende además de la posible contaminación, y de la riqueza del material inicial, del prensado y/o lavado aplicado al CPF. En el cuadro general de composición del CPF según diferentes autores - la proporción de cenizas brutas oscila entre 6,0 % y 19,2 %.

Por lo tanto el dato obtenido por nosotros de 10,57 % de la substancia seca (tabla 27) podemos considerarlo como habitual para este producto.

Como en el residuo fibroso, se determinaron cuantitativamente los minerales: calcio, fósforo, magnesio, hierro, manganeso, cobre

zinc, obteniéndose como promedio los datos que figuran en la tabla 28.

La proporción de Ca es inferior a la hallada por GERLOFF(1965) y KUZMICKY y col. (1972) 1,5 % y 2,3 %, respectivamente (tabla 25). El P sin embargo, se encuentra entre 0,27 y 0,40 citados respectivamente por los mismos autores. De los demás minerales no tenemos referencias.

Tabla 25.- COMPOSICION QUIMICO-BROMATOLOGICA DE CONCENTRADO PROTEICO FOLIAR DE ALFALFA.

(Según diferentes autores y en distintos procesos industriales).

%	GERLOFF (1965)	KUZMICKY y col. (1972)	GALOPINI y col. (1978)
Humedad	12,0	11,0	-
Proteína bruta	58,0	38,8	56,2
Fibra bruta	-	2,3	6,2
Extracto etéreo	4,5	6,2	10,8
Cenizas	6,0	19,2	13,2
Calcio	1,5	2,3	-
Fósforo	0,27	0,4	-
Sodio	0,20	0,3	-

2.3.3.5.- Composición aminoacídica. En la tabla 28 se da la proporción en g. por 16 g. de nitrógeno de: aspártico, treonina, serina, glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina, arginina y cistina del concentrado protéico obtenido en la primera -

Tabla 26.- COMPOSICION QUIMICO-BROMATOLOGICA DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L.
(en % de la substancia seca)

Fraccionamiento nº.	Proteína verdadera.	Extracto etéreo.	Fibra Neutro-detergente	Fibra ácido-detergente	Hemicelulosas
1	37,56	12,24	1,50	0,44	1,06
2	36,81	12,51	1,42	0,86	0,56
3	37,28	12,31	1,59	0,61	0,98
4	40,91	15,76	1,83	0,62	1,21
5	35,34	14,51	1,05	0,45	0,60
6	34,43	14,12	1,46	0,34	1,12
7	35,87	14,71	1,17	0,96	0,21
8	34,75	13,50	1,95	1,05	0,90
9	36,53	16,45	2,07	0,99	1,88
10	31,47	13,00	2,51	1,14	1,37
11	33,00	11,43	2,53	1,14	1,39
12	33,47	12,52	2,44	1,09	1,35
<hr/>					
\bar{x}	35,62	13,59	1,79	0,81	0,99
σ_{n-1}	2,48	1,54	0,51	0,30	0,36
C.V.	6,96	11,33	28,49	37,04	36,36

Proteína verdadera calculada: $(N \text{ total} - N \text{ no protéico}) \times 6,25$

Tabla 27.- COMPOSICION MINERAL DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PQANTA
DESGRANADA DE Pisum sativum, L.

Fraccionamiento nº	Cenizas % (a.s.)	Ca %(a.s.)	P %(s.s.)	Mg %(s.s.)	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
1	7,87	0,81	0,30	0,17	1940	24,34	25,68	35,39
2	10,68	0,83	0,32	0,17	1955	26,07	29,00	37,70
3	9,87	0,82	0,32	0,17	1948	25,21	27,04	36,14
4	9,85	0,82	0,31	0,18	1949	25,22	27,64	36,94
5	9,43	0,92	0,31	0,18	2072	31,59	25,13	33,02
6	9,88	0,94	0,32	0,19	2125	31,92	26,30	34,36
7	10,05	0,95	0,32	0,19	2126	32,24	27,02	34,96
8	11,08	0,96	0,33	0,19	2177	32,58	28,19	36,30
9	11,13	0,95	0,32	0,20	2110	39,68	27,12	41,40
10	11,38	0,96	0,33	0,21	2120	40,07	27,78	41,69
11	12,04	0,97	0,33	0,21	2122	40,08	28,38	41,75
12	13,53	0,97	0,34	0,21	2133	40,46	29,05	42,05
\bar{x}	10,57	0,91	0,32	0,19	2064,75	32,45	27,36	37,64
σ_{n-1}	1,43	0,07	0,01	0,01	89,29	6,36	1,23	3,24
C.V.	13,53	7,69	3,12	5,26	4,32	19,60	4,50	8,61

fase del proceso de extracción. Además se han calculado e incluido en dicha tabla el Chemical Score, el Valor químico y los niveles de aminoácidos esenciales del huevo entero y de la proteína -- de referencia de la F.A.O. (1965).

En los estudios iniciales de CHIBNALL en 1939 (en PIRIE, - 1971) se reveló ya que la composición aminoacídica de la proteína foliar es muy similar independientemente de la fuente vegetal de que proceda, no obstante pequeñas diferencias fueron observadas -- especialmente en aminoácidos básicos y azufrados por SMITH y AGI-ZA (1951) y STEWARD y col. (1954) quienes hallaron que el extracto protéico de hojas maduras contenía menos aminoácidos básicos -- que la proteína de hojas jóvenes, en experiencias con Gramíneas y Lupinus sp., y por LUGG y WELLER (1948) que detectaron una disminución de metionina acompañada de un incremento de cist(e)ina, -- asociados al incremento de edad de la hoja.

Efectivamente, los resultados obtenidos en fechas más recientes, al descubrirse métodos de determinación más cuidadosos, -- no son comparables con los citados anteriormente, especialmente -- en lo referente a los aminoácidos más lábiles, llegándose a la conclusión de que generalmente la composición aminoacídica de la proteína foliar total (no fraccionada) de diferentes especies, es simililar y no resulta fundamentalmente afectada ni por la edad fisiológica, ni el estado de la planta, ni por el tratamiento con fertilizantes (CHIBNALL y col., 1963; GERLOFF y col., 1965; WILLSON y TILLEY, 1965; BYERS, 1971....). Las pequeñas variaciones que se -- observan son mayores para algunos aminoácidos que para otros; -- GERLOFF y col. (1965) encontraron, que además de en los aminoáci-

dos azufrados, existen diferencias en las cantidades de prolina y lisina (de 3,5 á 5,4 y de 4,5 á 7,2 % g. de aminoácido sobre 100 - g. de aminoácidos recuperados, respectivamente). Los resultados de la prolina deben tenerse menos en cuenta debido a la mayor inexactitud de esta determinación. CHIBNALL y col. (1963) piensan que la cantidad total de lisina en hidrolizados ácidos puede ser subestimada en un 10-15 % y BYERS (1971) encontró que las proteína coaguladas por calor contienen de 10-15 % menos lisina que las precipitadas por ácido. Los aminoácidos azufrados siempre presentan problemas debido a su inestabilidad, la proporción de metionina depende por tanto del método de análisis como de las condiciones a las cuales es hidrolizada la muestra. La proteína extraída de hojas de cereales y Gramíneas pratenses parece contener algo más metionina que la proteína de otras especies (CHIBNALL y col. 1963; GERLOFF y col. 1965; BYERS, 1971).

La composición aminoacídica de la fracción "cloroplástica" es similar a la del CPF total, excepto que la lisina se reduce al 5,2 % de la proteína, comparado con el 6,8 % en el CPF no fraccionado (BYERS, 1971). En la fracción "citoplásmica" se ha encontrado menos leucina y más histidina y lisina que en la "cloroplástica".

En contraste con las proteína de semillas, el CPF de la planta desgranada de Pisum sativum es rico en lisina (6,54 g. de lisina por cada 100 g. de proteína) igual que ocurre con los concentrados protéicos de otras especies.

Los niveles de aminoácidos esenciales, como usualmente ocurre en los CPFs, están también en este caso, por encima de los recomendados provisionalmente por la FAO(1965),excepto la metionina.

Tabla 28.- COMPOSICION AMINOACIDICA DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L.

Aminoácido	g de aminoácido sobre 16 g de - nitrógeno.	Aminoácidos esenciales.	CPF	FAO (1965) recomendación provisional.	Huevo entero	Chemical score.	Valor químico
Apártico	8,96	Metionina	1,57	2,2	4,1	38,29	- 61,71
Treonina	4,70	Isoleucina	4,78	4,2	8,0	59,75	- 40,25
Serina	4,56	Valina	5,25	4,2	7,3	71,92	- 28,08
Glutámico	12,21	Fenilalanina	4,65	2,8	6,3	73,81	- 26,20
Prolina	4,15	Leucina	7,37	4,8	9,2	80,11	- 19,89
Glicina	4,84	Lisina	6,54	4,2	7,2	90,83	- 9,17
Alanina	5,06	Arginina	5,99	-	6,4	93,59	- 6,41
Valina	5,25	Treonina	4,70	2,8	4,9	95,92	- 4,08
Metionina	1,57	Histidina	2,50	-	2,1	119,05	- 19,05
Isoleucina	4,78						
Leucina	7,37						
Tirosina	3,63						
Fenilalanina	4,65						
Lisina	6,54						
Histidina	2,50						
Arginina	5,99						
Cistina	1,07						

Indice de Oser = 76,94

EAAI

(índice de aminoácidos esenciales)

El primer aminoácido esencial que puede actuar como limitante del valor biológico del CPF es la metionina, seguido de isoleucina, y más lejos de valina, fenilalanina, leucina, lisina, arginina y treonina en relación con la proteína de huevo entero. Esto está en línea con las conclusiones de SCOTH y col. (1971) y HOVE y col., 1974, quienes indican que el primer aminoácido esencial limitante es la metionina o el total de metionina + cist(e)ina. Sin embargo, los valores determinados en nuestro caso para estos aminoácidos azufrados (1,57 y 1,07 % de la proteína, respectivamente) -- son algo inferiores a los señalados ocasionalmente por otros autores:

La metionina constituye alrededor del 2 % de la proteína en el CPF (GERLOFF y col., 1965; LEXANDER y col., 1970) y WILSON y -- TILLEY (1965), estimaron que la cist(e)ina constituye 0,7-0,8 %; -- pero seguramente estas estimaciones son bajas, debido a la destrucción de cist(e)ina durante la hidrólisis. BYERS (1976) describe un procedimiento para estimar el total de aminoácidos azufrados en -- CPF, por oxidación total del azufre orgánico y determinación del -- sulfato de la muestra. Usando esta técnica la metionina y cist(e)ina juntas comprenden el 4,5 % de la proteína, y por diferencia, -- la cist(e)ina supondrá el 2,5 %.

Esta deficiencia en metionina no es preocupante desde ningún punto de vista, dada la facilidad de suplementación en su caso por la obtenida en síntesis química.

Sin embargo, en algunos casos los test biológicos resultan indispensables (como ocurre con los CPF de alfalfa y en general con los de leguminosas) cuando el valor nutritivo resulta afectado no

-111-

sólo por el patrón de aminoácidos, sino también por la presencia de factores tóxicos o antinutritivos y por la indisponibilidad de algunos aminoácidos. Por consiguiente, hemos realizado pruebas de valoración nutritiva de nuestro CPF en ratas.



BIBLIOTECA

3.2.3.4.- VALORACION NUTRITIVA.

3.2.3.4.1.- Resultados: En las tablas 29, 30, 31 y 32 se dan los valores medios obtenidos en los experimentos realizados tanto para la determinación de los valores básicos (nitrógeno metabólico fecal y nitrógeno endógeno urinario), como de los de balance del N. En las tablas 33 y 34 se resume el análisis estadístico de los referidos resultados, que se ilustran en la figura 8.

El nitrógeno ingerido diariamente por cada rata con el concentrado protéico de la planta desgranada de Pisum sativum, fué inferior, aunque no significativamente (tabla 30), que el ingerido con la dieta de albúmina de huevo comercial. Cuando aquel se suplementó con metionina al 0,3 % se incrementó significativamente ($P < 0,01$) la ingestión y fué algo superior a la de albúmina de huevo, aunque no de modo significativo.

Los coeficientes de digestibilidad aparente y verdadera de la proteína del CPF de la planta desgranada de guisante (75,52 y 87,64, respectivamente), fueron significativamente inferiores ($P < 0,01$) a los de la albúmina de huevo comercial (87,69 y 95,66, tabla 30), como puede comprobarse por el análisis estadístico (tablas 33 y 34), aunque en mucho mayor grado el primero que el segundo (12,7 y 8,02 unidades menos, respectivamente). La suplementación del CPF con metionina (tabla 32) supuso un incremento altamente significativo ($P < 0,01$) del coeficiente de digestibilidad aparente (81,33), no así de la verdadera (87,53), continuando ambos por debajo de los correspondientes de la albúmina de huevo de modo altamente significativo ($P < 0,01$).

El valor biológico de la proteína del CPF (68,83) muestra mayor diferencia que los coeficientes de digestibilidad con el -- grupo testigo (94,54 albúmina de huevo, tabla 30), siendo esta diferencia altamente significativa ($P < 0,01$) e igual a 25,71 unidades. La suplementación de aquel con metionina incrementó muy significativamente ($P < 0,01$) dicho valor biológico (80,59, tabla 32) menteniénndose, no obstante inferior de modo muy significativo --- ($P < 0,01$), al de la proteína utilizada como referencia, que tuvo en este caso un valor 13,53 unidades mayor.

Como consecuencia de los datos anteriores, también hubo diferencias significativas ($P < 0,01$) en la utilización neta de la - proteína del concentrado de la planta desgranada de Pisum sativum, L. (59,70), respecto de la de albúmina de huevo comercial (90,50) tabla 30, y de aquel suplementado con metionina (70,54) si bien - mejoró muy significativamente ($P < 0,01$) con la suplementación, - (tabla 32).

3.2.3.4.2.- Discusión de los resultados. La ingestión de alimentos por las ratas ha sido muy estudiada(pre J. HENRY y RERAT, 1966) y aunque quedan aún ciertos aspectos por explicar, que afectan -- tanto a la aceptabilidad como a la cantidad que se ingiere, uno - de los factores que determinan ambos parámetros es la composición más o menos equilibrada de la proteína.

Ensayos ya muy antiguos realizados por OSBORNE y MENDEL -- (1917) y otros posteriores demostraron que las preferencias de la rata se dirigen hacia un régimen equilibrado. HENRY y RERAT, ya - mencionados, demostraron que el consumo de alimento está regulado,

Tabla 29.- VALOR NUTRITIVO DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DES-
GRANADA DE *Pisum sativum*, L. EN RATAS

Determinación de los valores básicos.

Grupo	Rata na	Ganancia en peso g/día	Pienso ingerido g de M.S./día	N ingerido mg/día	N endógeno urinario excretado mg/día	N metabóli- co fecal excretado mg/día
TESTIGO 1	1	1,07	8,43	53,95	23,48	9,77
	2	0,80	5,80	37,12	18,90	7,24
	3	0,70	5,56	35,58	19,86	5,83
	4	0,80	6,29	40,25	20,59	7,71
	5	0,47	6,29	40,25	23,73	8,23
	6	0,93	7,63	48,83	24,21	12,31
	7	1,00	6,96	44,54	21,55	10,39
PROBLEMA 1	1	0,63	5,30	53,92	17,93	8,44
	2	0,73	6,26	40,06	18,89	9,21
	3	-0,13	5,23	33,47	19,14	8,45
	4	1,07	8,36	53,50	24,93	12,87
	5	0,93	8,03	51,39	23,48	11,52
	6	0,53	6,83	43,71	22,52	12,75
	7	1,07	8,30	53,12	24,21	13,37

Tabla 30.- VALOR NUTRITIVO DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL EXPERIMENTO DE LA PLANTA DESGRANA-
DA DE *Pisum sativum*, L. EN RATAS.

BALANCE DE N.

Grupo	Rata nº	Pienso ingerido g de M.S./ día	N ingerido mg/día	N excreta do en - orina mg/día	N excreta do en - heces mg/día	Digesti- bilidad aparen- te	Digestibi- lidad ver- dadera	Valor biológico	Utilización protéica neta
TESTIGO 1 (Albúmina de huevo comercial)	1	8,11	129,76	29,85	15,58	87,99	95,52	94,86	90,61
	2	4,93	78,88	20,15	15,22	80,70	89,88	98,24	88,30
	3	5,70	91,20	22,98	9,52	89,56	95,95	96,43	92,52
	4	6,36	101,76	27,10	9,84	90,33	97,90	93,46	91,50
	5	7,47	119,52	31,44	15,96	86,65	93,53	93,10	87,08
	6	8,12	129,92	38,30	14,76	88,65	98,12	88,95	87,28
	7	6,84	109,44	25,10	11,01	89,94	99,43	96,74	96,19
	X		108,64			87,69	95,76	94,54	90,50
PROBLEMA 1 (CPF)	1	5,17	82,72	46,68	19,19	76,80	87,00	60,05	52,24
	2	5,45	87,20	46,68	19,60	77,52	88,08	63,82	56,21
	3	5,22	83,52	41,52	21,57	74,14	84,29	68,21	57,49
	4	6,66	106,56	46,90	25,79	75,80	87,87	76,54	67,26
	5	5,83	93,28	49,69	23,52	74,78	87,14	67,75	59,04
	6	4,78	76,48	44,82	18,12	76,31	92,98	68,64	63,82
	7	6,50	104,00	49,48	27,80	73,27	86,12	71,79	61,83
	X		90,54			75,52	87,64	68,83	59,70
C.V.	u-1		12,29			1,51	2,68	4,27	5,03
	C.V.		13,57			2,00	3,06	6,20	8,42

Tabla 31.- VALOR NUTRITIVO DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA
DESCRANADA DE *Pisum sativum*, L. SUPLEMENTADO CON METIONINA AL 0,3 %, EN RATAS.

Determinación de los valores básicos.

Grupo	Rata na	Ganancia en peso g/día	Pienso ingerido g de M.S./día	N ingerido mg/día	N endógeno urinario excretado mg/día	N metabóli- co fecal excretado mg/día
TESTIGO 2	1	0,70	5,56	35,58	13,18	4,20
	2	0,63	4,63	29,63	10,04	5,08
	3	0,23	5,33	34,11	10,98	6,25
	4	1,23	6,03	38,59	11,30	5,08
	5	0,37	3,93	25,15	10,67	3,79
	6	0,43	5,26	33,66	12,55	4,31
	7	0,57	5,36	34,30	11,61	6,25
PROBLEMA 2	1	0,40	5,40	34,50	9,43	8,41
	2	0,27	4,10	26,24	8,57	7,67
	3	0,63	5,20	33,28	10,72	9,10
	4	0,83	4,80	30,70	10,29	8,01
	5	0,67	5,43	34,75	10,72	9,96
	6	0,47	4,73	30,27	8,57	8,87
	7	0,87	4,70	30,08	8,14	8,50

Tabla 32.- VALOR NUTRITIVO DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DES-
GRANADA DE *Pisum sativum*, L. SUPLEMENTADO CON METIONINA AL 0.3 %, EN RATAS.

BALANCE DE N

Grupo	Rata na	Pienso ingerido g de M.S./ día	N ingerido mg/día	N excre- tado en orí- na mg/día	N excre- tado en heces mg/día	Digesti- bilidad aparente	Digesti- bilidad verdadera	Valor biológico	Utiliza- ción pro- téica neta.
TESTIGO 2 (Albumina de huevo comercial)	1	9,36	149	22,07	8,91	94,02	96,84	93,84	90,87
	2	8,55	136	19,83	11,71	91,39	95,12	92,43	87,92
	3	7,10	113	16,61	9,81	91,32	96,85	94,76	91,77
	4	9,64	154	18,76	10,97	92,88	96,17	94,96	91,32
	5	6,11	97	16,52	5,70	94,14	98,03	93,85	92,00
	6	8,67	138	19,15	8,64	93,74	96,86	95,06	92,07
	7	7,12	113	18,37	8,16	92,78	98,31	93,91	92,32
	X		128,57			92,89	96,88	94,12	91,18
PROBLEMA 2 (CPF + Metionina 0,3 %)	1	7,78	124	31,31	25,17	79,70	86,48	79,60	68,84
	2	9,08	145	31,60	28,43	80,39	85,68	81,46	69,79
	3	9,77	156	37,54	29,80	80,90	86,73	80,18	69,54
	4	8,97	143	34,91	24,81	82,55	88,25	80,49	71,03
	5	9,04	144	34,13	26,50	88,60	88,51	81,63	72,25
	6	7,25	116	28,59	22,17	80,89	88,53	80,51	71,28
	7	9,99	159	35,88	26,73	83,19	88,53	80,29	71,08
	X		141,00			81,33	87,53	80,59	70,54
C.V.			15,76			1,24	1,20	0,72	1,19
			11,18			1,52	1,37	0,89	1,69

Tabla 33.- VALORES DE LA T DE STUDENT APLICADA A LA COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE VALOR NUTRITIVO DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L., EN RATAS.

Valores medios comparados	Ingestión	Digestibilidad aparente.	Digestibilidad verdadera	Valor Biológico	Utilización protéica neta
T ₁	-1,71 N.S.	-3,65 **	- 0,81 N.S.	0,32 N.S.	-0,47 N.S.
T ₂					
T ₁	1,95 N.S.	8,23 **	4,76 **	12,54 **	12,69 **
P ₁					
T ₂	1,18 N.S.	16,72 **	14,34 **	28,68 **	26,49 **
P ₂					
P ₁	-6,24 **	-7,36 **	0,09 N.S.	-6,54 **	-5,18 **
P ₂					

T₁ = Grupo testigo 1.- T₂ = Grupo testigo 2.- P₁=Grupo problema 1.- P₂ = Grupo problema 2.
 ** P<0,01.- N.S. No significativo

Como hubo diferencias significativas entre los grupos testigos de ambos experimentos en la digestibilidad aparente, éstas pudieran enmascarar los resultados y conclusiones entre los demás grupos para ese parámetro. Para evitarlo, sometimos los cuatro grupos de animales (testigo y problema de ambos experimentos) a un análisis conjunto de la varianza (F) y, en el caso de que ésta fuera significativa, a una comparación de las medias (M.O.S.) de los resultados de la digestibilidad aparente.

Para ello consideramos:

1 bloque = 1 animal

Tratamientos = los cuatro grupos de animales de ambos experimentos, según la fuente proteica de la dieta.

Tabla 34.- ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE LOS RESULTADOS DE DIGESTIBILIDAD APARENTE DEL CPF DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L. Y PRUEBA DE COMPARACION DE MEDIAS.

Análisis de la varianza						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Calculada	F Teórica	
Total	1305,6	27	48,3555		5 %	1 %
Bloques	30,665	6	5,1183	0,814725	2,60	4,01
Tratamientos	1162,02	3	387,339	61,7464**	3,16	5,09
Error	112,915	18	6,27307			

** $P < 0,01$

Tabla 34.- (Continuación)

Prueba de comparación de medias

$$\begin{array}{lcl} \text{M.D.S.} = 1,33877 \times T & 5 \% ; \text{M.D.S.} = 1,33877 \times 2,101 & = 2,81 \\ & 1 \% ; \text{M.D.S.} = 1,33877 \times 2,878 & = 3,85 \end{array}$$

		P ₁	P ₂	T ₁	T ₂
	Valores medios	75,52	81,33	87,69	92,89
T ₂	92,89	17,32 ^{**}	11,56 ^{**}	5,20 ^{**}	
T ₁	87,69	12,17 ^{**}	6,36 ^{**}		
P ₂	81,33	5,81 ^{**}			
P ₁	75,52				

T₁ = Grupo testigo 1

T₂ = Grupo testigo 2

P_1 = Grupo problema 1

P₂ = Grupo probleme 2

**** P < 0,01**

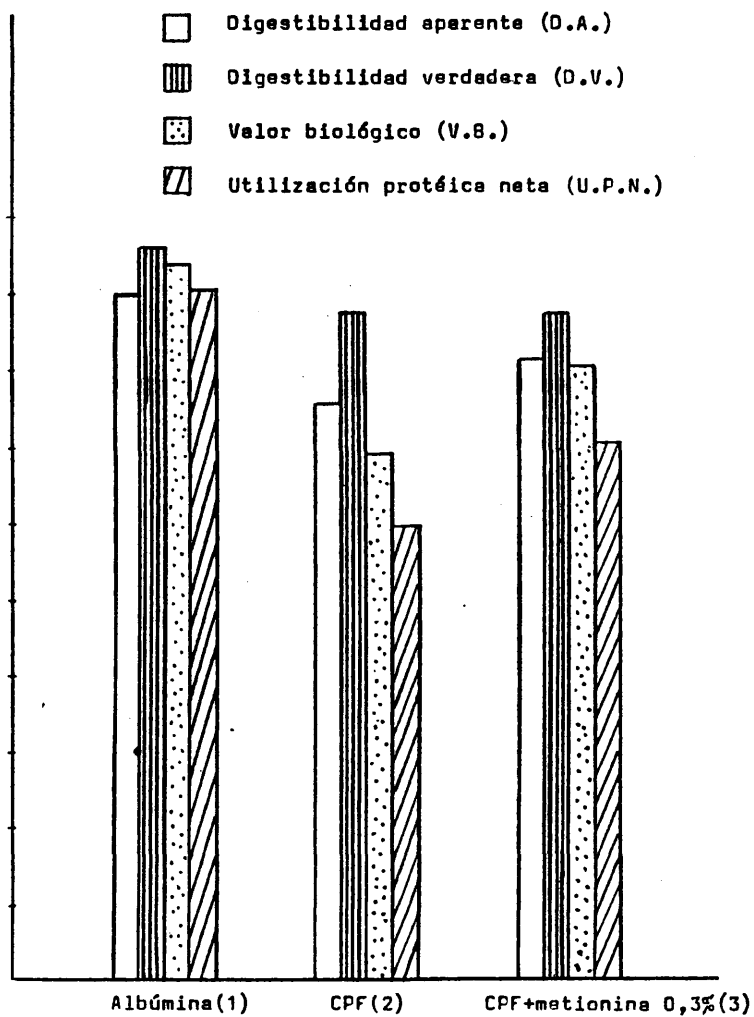


Figura 8.- VALOR NUTRITIVO DEL CPF DE LA PRIMERA FASE DEL FRACCIONAMIENTO DE LA PLANTA DESGRANADA DE *Pisum sativum*, L. CON Y SIN SUPLEMENTACION CON METIONINA, COMPARADO CON LA ALBUMINA DE HUEVO COMERCIAL, EN RATA.

- (1) Valores medios de los grupos testigos 1 y 2.
- (2) Valores medios del grupo problema 1
- (3) Valores medios del grupo problema 2.

en la rata en crecimiento, por las necesidades energéticas y más precisamente por la intensidad de proteinogénesis, que es función del nivel de crecimiento y del grado de retención de nitrógeno permitido por la calidad y cantidad de las proteínas ingeridas. Para una cantidad dada de proteína, la velocidad de crecimiento y el consumo de energía son tanto más elevados cuando la fuente nitrogenada es de mejor calidad (hecho también revelado por CALET y col., 1961, en pollos).

De ello se deduce que la suplementación del CPF con metionina, eleve significativamente la ingestión aunque, en todos los grupos, los coeficientes de variación de la cantidad diaria ingerida por rata fueron muy acusados.

Los valores de los demás parámetros determinados por nosotros varían significativamente de los obtenidos por otros investigadores. Estas variaciones pueden explicarse por tres motivos, a parte del obvio de la distinta riqueza del material inicial: a) la distinta relación entre proteína citoplásmica y cloroplástica; b) la posible desnaturalización de las proteínas y bloqueo de la lisina provocado por los tratamientos y c) la posible presencia de depresores del crecimiento, tales como las saponinas tan estudiadas en la alfalfa (WOODHAM en PIRIE, 1971). Respecto al distinto valor de las proteínas citoplásmicas y cloroplásticas, ya DAVIES y col. (1952) en las primeras determinaciones sobre extractos proteícos foliares encontraron que tanto la digestibilidad como el valor biológico de fracciones citoplásmicas eran de 20 a 25 unidades superiores a los de las fracciones cloroplásticas. Los estudios posteriores de SUBBA RAU y col. (1969) confirman la superioridad de -

la proteína citoplásmica sobre la cloroplástica. A la misma conclusión llegó HORIGOME (1977) determinando la digestibilidad verdadera y valor biológico de proteínas cloroplásticas y citoplásmicas de avena y trébol ladino. Finalmente, BRAY (1977) encontró también que la citoplásmica tiene digestibilidad muy alta, equivalente a las mejores proteínas alimenticias, mientras que la digestibilidad del nitrógeno en la fracción cloroplástica era mucho más baja.

Esta superioridad de la proteína citoplásmica es atribuible a la presencia en la fracción cloroplástica de proteínas que forman parte de la pared celular o de la membrana cloroplástica, que son resistentes a la digestión en el intestino animal, y a una composición aminoacídica más equilibrada, como demuestran los análisis comparativos realizados por BYERS, 1971, tabla 35.

Frecuentemente el menor valor nutritivo de la proteína foliar "no fraccionada" con referencia al huevo completo o la caseína, ha sido atribuido a la deficiencia en metionina. Sin embargo, el valor nutritivo de la proteína citoplásmica similar en metionina, se aproxima al de la caseína (HENRY y FORD, 1965). Ello hace pensar que la cantidad de aminoácidos esenciales presentes en la fracción citoplásmica, están razonablemente equilibrados. De todo esto, unido a la evidencia de la suplementación con metionina (HENRY y FORD, 1965; SHURPALEKAR y col., 1969), se deduce que en ciertos casos existe una dificultad de la utilización digestiva de la metionina, más que una deficiencia en la proteína no fraccionada.

Mientras en una fracción "citoplásmica" se obtuvo el 100 % de metionina disponible (determinada microbiológicamente con - -

Tabla 35.- COMPOSICION AMINOACIDICA DE PROTEINAS CLOROPLASTICAS, NO-FRACCIONADAS Y CITOPLASMICAS DE HOJAS DE CEBADA Y ALTRAMUZ.
(g. de aminoácido: por cada 100 g. de aminoácidos recuperados).

Amino ácido	Cloroplástica		No-fraccionada		Citoplásmica	
	Cebada	Altramuz	Cebada	Altramuz	Cebada	Altramuz
Aspártico	9,75	10,10	9,57	10,22	9,62	10,01
Treonina	4,82	4,97	5,07	5,01	5,41	5,04
Serina	4,85	5,15	4,40	4,68	4,10	4,13
Glutámico	11,00	11,35	11,41	11,88	11,94	12,15
Prolina	4,88	5,06	4,68	4,79	4,62	4,79
Glicina	6,12	5,97	5,64	5,69	5,38	5,32
Alanina	7,05	6,40	6,71	6,21	6,52	5,99
Valina	6,16	6,10	6,37	6,27	6,50	6,32
Metionina	2,28	1,90	2,24	1,70	2,39	1,76
Isoleucina	5,25	5,76	4,95	4,93	4,74	4,42
Leucina	10,43	10,68	9,33	9,75	8,42	9,21
Tirosina	4,49	4,20	4,50	4,61	4,92	5,56
Fenilalanina	6,97	7,16	6,22	6,24	5,84	5,82
Lisina	5,60	4,78	6,61	6,60	7,06	7,30
Histidina	1,82	1,91	2,34	2,31	2,66	2,82
Arginina	6,29	6,13	6,89	6,35	7,01	6,67

BYERS, M. 1971.- The amino acid composition of some leaf protein preparations. In leaf Protein: its agronomy, preparation, quality and use N.W. PIRIE. IBP Handbook No 20, 1971. p.108.

Streptococcus zymogenes), solo se alcanzó el 40 % con un sedimento de fracción "cloroplástica" y en la no fraccionada era disponible alrededor del 90 % (FORD, 1970, citado por PIRIE, 1971).

Además del distinto valor de las fracciones, dentro del método de preparación se han estudiado muy minuciosamente los efectos del sistema de secado y de la técnica de precipitación como principales factores que afectan a la calidad nutritiva de los CPF_s.

La influencia de los métodos de secado fué estudiada por DUCKWORTH y WOODHAM (1961) con CPE de alfalfa. Probaron 5 métodos: a) absorción de la humedad por la porción basal cereal de las digestas, b) secado con acetona y calentando al final a 30°C al vacío, c) secado a 40°C una mezcla de CPE y cebada 1:1, d) liofilizando, y, finalmente e) secado con aire a 100°C. Solo el último tratamiento que implicó temperatura elevada redujo el valor nutritivo significativamente.

Esto fué en parte confirmado por HENRY y FORD (1965) que observaron una calidad satisfactoria de CPE preparados por secado con acetona, liofilización, o con corriente de aire sobre almidón. También confirmaron que el secado en estufa a 100°C da un producto de muy reducido valor biológico y menor digestibilidad verdadera. Al mismo resultado llegaron SUBBA RAO y SING (1970) determinando el PER en ratas.

BUCHANAN (1969b) también llevó a cabo experimentos en este sentido ensayando varios métodos de secado: calor húmedo, calor húmedo seguido de extracción por cloroformo, extracción con sol--

ventes acidificados. Ninguno de estos métodos afectó significativamente al V.B. aunque todos hicieron decrecer la digestibilidad verdadera, UPN y PER.

DUCKWORTH y WOODHAM (1961) estudiaron los efectos de diferentes temperaturas de secado de CPF de centeno, encontrando que el valor nutritivo solamente se afectaba cuando se sobrepasaron los 82°C.

BARBER y col. (1959) llegaron a la conclusión de que secando a baja temperatura se puede obtener un producto de alto valor nutritivo ya que no encontraron diferencia en el crecimiento o en la eficiencia de utilización del alimento entre la harina de pescado y CPF en experimentos llevados a cabo con cerdos. Tampoco se encontró diferencia en la eficacia de suplementación de dietas con cereales con CPF respecto a los suplementados con harina de pescado en gallinas ponedoras, en cuanto a número y peso de los huevos -- (HUGHES y EYLES, 1953 a,b) aunque sí una tendencia de las primeras a producir albúminas verdosas.

También en este apartado pueden incluirse los trabajos de WOODHAM y col. (1968) sobre los efectos del calentamiento sobre el valor nutritivo, la composición protéica y la inhibición de la actividad enzimática. KOHLER (1972) (citado por WILKINS, 1977) indicó que para mantener un alto grado de digestibilidad de la proteína y un elevado contenido en xantofilas, el coágulo protéico debe retirarse rápidamente, si es posible, después de su coagulación a 80-85°C.

Por consiguiente se deduce que durante la desecación pueden

producirse daños sustanciales en el valor nutritivo particularmente cuando actúan temperaturas elevadas o el proceso se prolonga durante mucho tiempo. Las últimas pruebas llevadas a cabo con rápidos procesados y liofilización del material, han mostrado que los CPF_g tienen una digestibilidad satisfactoria y dan valores de VB y PER consistentes con su composición aminoacídica, como confirman nuestros trabajos.

La digestibilidad verdadera del CPF de la planta desgranada de P. sativum fué también superior a las citadas para todas las especies de la tabla 36 (resumen de diferentes pruebas realizadas en rata con CPF_g obtenidos a escala de laboratorio y secados a temperaturas bajas, como en nuestro caso). Las diferencias específicas fueron ya observadas por HENRY (1963), WOODHAM (1965) en resultados de valor biológico. SINGH (en PIRIE, 1971), señala que son debidas más a la ingesta y digestibilidad que a la calidad de la proteína. Pensamos que la superior digestibilidad de nuestro CPF con relación al de otras especies, principalmente de leguminosas, se debe a la escasa proporción de inhibidores del crecimiento existentes en el P. sativum, uno de cuyos efectos es el de aumentar las pérdidas de nitrógeno en las heces (GONTZEA y col., 1968).

La diferencia de digestibilidad verdadera con relación a la albúmina de huevo que sigue manteniéndose después de la suplementación con metionina habrá que achacarla a otras causas diferentes de la deficiencia en metionina, entre ellas, alguna o algunas de las señaladas por WOODHAM que ya hemos citado antes. En este caso concreto pensamos que se deberá principalmente a la pre

Tabla 36.- RESUMEN DE DIFERENTES PRUEBAS REALIZADAS EN RATA CON CPF

Fuente	Nivel de proteína de la dieta %	Digestibilidad verdadera del nitrógeno	Valor biológico	Valor proteína neta	PER	Referencia
Alfalfa	10	79-86	-	-	2,1	Booth y col. (1971)
Alfalfa	8	82	-	-	1,1	Hora y col. (1974)
Alfalfa	11	-	-	-	1,4	Subba Rau (1969)
Guisante	8	81	65	53	-	Henry y Ford (1965)
Trébol rojo	8	71	54	38	-	Henry y Ford (1965)
Trigo	8	80-86	71-91	59-79	-	Henry y Ford (1965)
Trigo	12	81	85	69	1,1 - 1,6	Buchanan (1969)
Trigo	11	-	-	-	2,3	Duckworth y Woodhan (1961)
Cebada	8	84	81	68	-	Henry y Ford (1965)
Centeno	8	77	76	58	-	Henry y Ford (1965)
Colza	8	85	78	56	-	Henry y Ford (1965)
Mostaza	8	82	74	60	-	Henry y Ford (1965)
Coliflor	11	86	77	66	1,9	Subba Rau y Col. (1972)

MORRIS, T.R., 1977.- Leaf protein concentrate for non-ruminant farm animals. In Green Crop Fractionation. WILKINS, R.J. (Ed.).- Occasional Symposium No. 9. British Grassland Society, 1977, p. 70.

sencia de material cloroplástico y, en segundo lugar a la de algunos inhibidores del crecimiento.

Entre los últimos se conoce la existencia del factor antitripsico aunque en proporciones muy inferiores a los de otras leguminosas de consumo humano (como Phaseolus vulgaris, Faba vulgaris, Cicer arietinum, Arachis hypogaea; GONTZEA y col., 1968). -- Dicho factor está constituido por, al menos, 9 iso-inhibidores -- (PM 105000 - 12.000) (LIENER, 1980). También se han detectado hemaglutininas (2 lectinas y últimamente una tercera que bien podría ser producto de hibridación de ambas). El cianógeno se da en proporciones sumamente bajas, como en las judías (20 ppm.). En muy raras ocasiones la ingestión de semillas de P. sativum ha producido síndrome hemolítico similar al favismo (LIENER, 1980).

A estas dos causas puede atribuirse la significativa diferencia de nitrógeno excretado en heces y que se traduce en la diferencia de digestibilidad con relación a la albúmina.

Comparando el VB de nuestro concentrado con el de otras especies (tabla 36) resulta superior al de otras leguminosas, pero inferior al de las especies de otras familias estudiadas. Es algo superior al encontrado por HENRY y FORD (1965) para un CPF de guisante ($65,2 \pm 1,82$), pensamos que ello se deberá a una mayor asimilabilidad de los aminoácidos azufrados y de la lisina debido al método de precipitación de la proteína empleado (calor a presión en el caso de HENRY y FORD, adición de ácido en nuestro caso).

WOLDEGIORGIS (1976) estudió la influencia de diferentes medios de precipitación sobre la calidad protéica y NANDA y col. -

(1977) comprobaron la superioridad nutritiva de la proteína obtenida por precipitación ácida.

Los principales procesos que ocasionan disminución de la asimilabilidad son los siguientes:

- 1.- El proceso de calentamiento reduce la asimilabilidad de la metionina y ELLINGER y PALMER, 1969, han mostrado que ello puede ser debido a la oxidación del péptido-metionina a sulfóxido (met-O). Los hidrolizados de proteína coaguladas por calor contienen usualmente más met-O que los de otros tipos BYERS, (1971) pero no se conoce si éste se produce durante la extracción, durante la hidrólisis o en ambos procesos. También existe más met-O en hidrolizados de proteínas procesadas lentamente (BYERS, 1970a).
- 2.- Las O-quinonas producidas por la oxidación enzimática de los ácidos clorogénico y cafeico en los extractos de plantas, se unen a los grupos tiol (PIERPOINT, 1969 a,b) y estas reacciones serán las responsables de la aparente inasimilabilidad de la cisteína en preparaciones que contengan material cloroplástico.
- 3.- Las O-quinonas y polifenoles también reaccionan con el grupo ϵ -amino de la lisina (PIERPOINT, 1969 a,b). Sin embargo, la disminución de la asimilabilidad de este aminoácido está asociado con las reacciones de Maillard entre el grupo ϵ -amino de la lisina y grupos aldehído que se dan al calentar. Esta reacción tiene lugar durante la coagulación por el calor.

Todas las proteínas obtenidas por procesos implicando tra-

tamientos con álcalis dan valores altos de fenol (FAFUNSO y BYERS, 1977).

Seguramente varias de estas reacciones citadas ocurren simultáneamente.

El inferior valor biológico del CPF con relación a la albúmina, que subsiste después de la suplementación con metionina, pensamos que se debe a que a estos niveles empieza a hacerse patente la inferioridad de la proteína del CPF en otros aminoácidos esenciales con relación a la albúmina de huevo, y la consecuencia de este desequilibrio acarrea una mayor cantidad de nitrógeno en la orina del grupo problema.

La adición de metionina ha supuesto un efecto favorable en la ingestión, digestibilidad aparente, valor biológico y utilización neta de la proteína del CPF de la planta desgranada de P. sativum. Ya HENRY y FORD, 1965; SHURPALEKAR y col., 1969, etc.) observaron que la adición de metionina mejora dietas que contienen proteína no fraccionada. Añadiendo lisina (SUBBA RAU y col., 1969; SHURPALEKAR y col., 1969) o isoleucina (HENRY y FORD, 1965) a la misma dieta no observaron efecto alguno, y cuando ambos son combinados con la metionina, la respuesta total no es mayor que con la metionina sola (HENRY y FORD, 1965; SHURPALEKAR y col., 1969). Debe tenerse en cuenta que estos resultados fueron obtenidos con ratas, que exigen más metionina que otras muchas especies (EGGUM, 1970).

También EGGUM (1970 b) confirmó la eficacia de dicha suplementación en dietas para ratas. El bajo valor biológico y UPN de

los CPF no suplementados: 44-57 y 30-40 respectivamente, ascendieron a 80 y 57 respectivamente con la adición de metionina.

SHURPALEKAR y col. (1969) y HANCZAKOWSKI (1974) comprobaron que la suplementación con lisina y metionina, mejoraba el valor biológico y la digestibilidad verdadera. Sin embargo en el caso del CPF de la planta desgranada de P. sativum la digestibilidad verdadera de la proteína, ya de por sí muy alta, no se modificó significativamente por la adición de metionina.

Usando el método de CARPENTER, se ha visto que el 70-80 % de la lisina es asimilable (WOODHAM, 1965). Por el procedimiento de desaminación con nitroso del VAN SLYKE, se han obtenido resultados semejantes (WOODHAM, 1965). En las fracciones cloroplásticas, el total de lisina no suele estar muy por encima del mínimo (4,2 %) recomendado por la FAO (1965) y, en consecuencia, si parte no es asimilable, estas fracciones deberán considerarse deficientes en lisina. En nuestro caso, la probabilidad de que el nivel de lisina asimilable sea insuficiente es casi nula, dada la elevada proporción de dicho aminoácido, por ello no verificamos suplementación con él.

4.- CONCLUSIONES

- 1.- Los coeficientes de extracción de la substancia seca y del nitrógeno total (37 % y 49 %, respectivamente), de la planta desgranada de guisantes, considerando las dos etapas del proceso de extracción, pueden considerarse moderados para este subproducto, con una elevada proporción de substancia seca, una proporción media de nitrógeno total y en una avanzada fase del ciclo de desarrollo. De las dos etapas, es la primera la más --- efectiva con mucha diferencia, alcanzándose en ella algo más --- del 75 % del coeficiente de extracción total, tanto de la substancia seca como del nitrógeno total.
- 2.- La partición de los compuestos nitrogenados en las diferentes fracciones de la primera etapa del proceso indican que mientras para componentes no protéicos los coeficientes de extracción --- superaron el 50 %, para el nitrógeno protéico dicho coeficiente fué del 25 % aproximadamente. La relación nitrógeno protéico extraído/nitrógeno total extraído (37 %) resultó baja, hecho atribuible seguramente: a la edad de la planta, a la baja proporción de nitrógeno protéico/nitrógeno total en la planta --- original y a la conservación de esta en cámara frigorífica.
- 3.- El rendimiento total del proceso en forma de CPF (casi 41 kg --- de P.B. ha⁻¹) aunque bajo en sí mismo, resulta comparable a --- los citados por diversos autores para otros subproductos de Papilionáceas y representa un incremento adicional al rendimiento de la cosecha principal (semillas), si bien sería necesario realizar un estudio económico de la energía complementaria que consumiría todo el proceso de fraccionamiento.

- 4.- El coeficiente de extracción en el CPF en la primera fase del proceso fué de 11,6 %, para el nitrógeno protéico mientras que para los compuestos nitrogenados no protéicos dicho coeficiente dió valores prácticamente despreciables debido a que por -- ser solubles fueron arrastrados por el suero.
- 5.- La composición químico-bromatológica del residuo fibroso muestra que se trata de un alimento grosero con una elevada proporción de fibra (FND 55,73 %, FAD 45,23 %) pero también con una adecuada proporción nitrógeno total (2,36 %) del que una parte considerable (80 %), es nitrógeno protéico. El coeficiente Ca/P (superior a 9) resulta desequilibrado.
- 6.- El valor nutritivo del residuo fibroso como alimento para rumiantes es comparable al de un heno de alfalfa de calidad media y su utilización supondría el aporte de energía (valor -- energético 0,64 U.A./kg S.S.) suficiente para producir unos -- seis millones de litros leche/año en nuestro país. La forma de conservación que estimamos más conveniente sería el ensilado -- con aditivos.
- 7.- La composición químico-bromatológica del CPF indica que sus -- constituyentes mayoritarios son: proteína, lípidos y extractivos libres de nitrógeno, si bien la proporción de proteína es relativamente baja para este tipo de concentrados. Es tico en lisina (6,54 g. por cada 16 g. de N) y el primer aminoácido -- esencial limitante es la metionina.

- 8.- El coeficiente de digestibilidad verdadera, el valor biológico y la utilización neta de la proteína determinados con ratas -- fueron comparables a los de otros concentrados, si bien todos estos parámetros y la digestibilidad aparente fueron significativamente inferiores ($P < 0,01$), a los de la albúmina de huevo comercial.
- 9.- La suplementación del CPF con metionina incrementó significativamente ($P < 0,01$) la digestibilidad aparente, valor biológico y utilización neta de la proteína, no así, la digestibilidad verdadera. No obstante D.A.; D.V.; V.B. y U.P.N., se mantuvieron significativamente por debajo ($P < 0,01$) de los de la albúmina de huevo, después de la suplementación con metionina.
- 10.- No se observaron síntomas de toxicidad por la inclusión del -- CPF de planta desgranada de guisante en la dieta de las ratas en la proporción ensayada del 10 % de P.B.

137

5.- RESUMEN

Con la finalidad de mejorar el aprovechamiento de la planta desgranada de guisante Pisum sativum, L. -subproducto importante de la industria conservera española- se ha estudiado su utilización sometiénola al proceso de extracción de la fracción proteínica, habiéndose determinado los rendimientos de dicho proceso, - así como la composición químico-bromatológica y el valor nutritivo de las dos principales fracciones obtenidas en el mismo: residuo fibroso y concentrado protéico foliar (CPF).

Para realizar el fraccionamiento se diluyó el zumo extraído hasta 90 g. de S.S. kg^{-1} de solución a pH natural, valorándose en cada una de sus dos etapas y para cada una de las fracciones importantes obtenidas -residuo fibroso, zumos y CPFs- los coeficientes de extracción de la materia seca y del nitrógeno total. En la primera etapa -que cuantitativamente supuso más del 75 % del rendimiento- se estudió además la partición del nitrógeno en cada una de las fracciones.

La composición químico-bromatológica del residuo y del CPF se determinaron según la partición de WEENDEE y la de VAN SOEST, que se completaron con análisis de minerales y, en el caso del CPF, con la determinación de aminoácidos.

La valoración nutritiva del residuo fibroso se hizo sobre la base de su composición y determinando la digestibilidad "in vitro" mediante la técnica de TILLEY y TERRY y la del CPF se verificó en ratas empleando el método de THOMAS-MITCHELL para la determinación de la digestibilidad (aparente y verdadera), valor biológico y utilización neta de la proteína con y sin suplementación con metionina.

-En el proceso completo, los coeficientes de extracción (% E) de la substancia seca y del nitrógeno total fueron 37 % y 49 % en el zumo y 3,9 % y 9,19 % en el concentrado, respectivamente. Mientras que en el zumo de la primera etapa se logró extraer más del 50 % de los distintos compuestos nitrogenados no-protéicos y aproximadamente un 25 % del nitrógeno protéico, en el CPF correspondiente solo quedó una parte residual de los primeros y un 11,61 % del nitrógeno protéico. Todos estos rendimientos considerados en sí mismos son bajos, sin embargo no lo son cuando se comparan con los obtenidos por otros autores y con otros subproductos. Los 41 kg. de proteína bruta (N x 6,25) que se obtienen por hectárea en forma de concentrado, constituyen un incremento apreciable del rendimiento de la cosecha principal (semillas de guisantes); aunque quedan por aclarar los aspectos económicos del proceso, fuera de los objetivos de este trabajo.

-La composición químico-bromatológica y la valoración nutritiva indican que el residuo fibroso resultante es muy adecuado como alimento de volumen para raciones de rumiantes, conteniendo una proporción suficiente -a pesar de la extracción- de alrededor del 14 % de proteína bruta (2,36 % de N total, del que un 80 % es protéico) y un valor energético de 0,64 U.A./kg S.S. y no habiendo necesidad de corregir más que su índice Ca/P (superior a 9). Se sugiere que su forma de presentación sea el ensilado con aditivos.

-El CPF obtenido dió valores de ingestión (90,54 mg de N/rata y día), coeficientes de digestibilidad verdadera (87,64) y aparente (75,52), valor biológico (68,83) y utilización neta de la proteína (59,70) que fueron, excepto el primero, significativamente in-

feriores ($P < 0,01$) a los de la proteína de referencia -albúmina de huevo-. La simple adición de metionina mejoró significativamente ($P < 0,01$) los tres últimos y la ingestión alcanzándose valores de 81,53, 80,59, 70,54 y 141 respectivamente, pero todos ellos excepto la ingestión, continuaron siendo significativamente inferiores ($P < 0,01$) a los de la albúmina. Por otra parte, no se apreciaron síntomas de toxicidad -al nivel del 10 % de P.B. en la dieta- por lo que parece indicado como complemento de dietas a base de cereales para monogástricos, dada su riqueza en lisina (6,54 g. por cada 16 g. de nitrógeno).

121

6.- B I B L I O G R A F I A

- ALLISON, R.M. and VARTHA, E.W., 1973.- Yields of protein extracted from irrigated lucerne.- New Zealand Journal of Experimental Agriculture., 1: 35.
- ANUARIO DE ESTADISTICA AGRARIA, 1966-79.- Ministerio de Agricultura. Madrid.
- A.O.A.C., 1965.- Official methods of analysis. 9th Ed. Washington, D.C.
- ARKCOLL, D.B. and FESTENSTEIN, G.N., 1971.- A preliminary study of the agronomic factors affecting the yield of extractable leaf protein.- J. Sci.Fd. Agric., 22: 49-56.
- ARKCOLL, D.B. and HOLDEN, M., 1973.- Changes in chloroplast pigments during the preparation of leaf protein.- J. Sci.Fd.Agric. 24: 1217-1227.
- BARBER, R.S., BRAUDE, R. and MITCHELL, K.G., 1959.- Leaf protein in rations of growing pigs.- Proc.Nutri.Soc., 18iii.
- BOOTH, A.N., SAUNDERS, R.M., CONNOR, M.A. and KOHLER, G.O., 1971.- In vivo and in vitro protein digestibility of alfalfa and concentrates. Proceedings Eleventh Technical Alfalfa Conference, 51-57. Berkeley: Agricultural Research Service, USDA.
- BRAY, J.W., 1973.- Leaf protein recovery.- Chemical Engineering J. 22: 76-77.
- BRAY, J.W., 1977.- The processing of leaf protein to obtain food-grade products. Occasional Symposium No. 9. British Grassland Society. Ed. Wilkins, R.J. 107-116.
- BREIREM, K., 1954.- Citado por DEMARQUILLY, C. y WEISS, P., 1970.- Tableaux de la valeur alimentaire des fourrages. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.

- BUCHANAN, R.A., 1969a.- Effect of storage and lipid extraction on the properties of leaf protein.- J.Sci.Fd.Agric., 20: 359-364.
- BUCHANAN, R.A., 1969b.- In vivo and in vitro methods of measuring nutritive value of leaf-protein preparations.- Brit. J. Nutri., 23: 533-545.
- BUTLER, G.W. and BAILEY, R.W., 1973.- Chemistry and Biochemistry of herbage. Ed. Academic Press. London and New York.
- BYERS, M., 1971.- Amino acid composition and in vitro digestibility of some protein fractions from three species of leaves of various ages.- J.Sci.Fd.Agric., 22: 242-251.
- BYERS, M., 1976.- Determination of S in extracted leaf protein.- J.Sci.Fd.Agric., 27: 131.
- CALET, C., JOUANDET, C., BARATOV, J., 1961.- Variation de la consommation spontanée d'énergie du poussin en fonction de la nature des matières azotées du régime.- Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 1: 1-9.
- CASARES, J., 1963.- Tratado de análisis químico- Tomo II. Análisis cuantitativo general. Madrid.
- CHAYEN, I.H., SMITH, R.H., TRISTRAM, G.R., THIRKELL, P. and WEBB, T., 1961.- The isolation of leaf components.- J. Sci.Fd.Agric. 12: 502-512.
- CHEESEMAN, G.C., 1974.- Paper presented at conference on Extraction and use of juice from Lucerne and Grass.- Reading, November. 1974.
- CHEESEMAN, G.L., 1977.- The chemical composition of forage juice and its preservation. Occasional Symposium No. 9. British Grassland Society. Ed. Wilkins, R.J., 39-46.

- CHIBNALL, A.C. and SCHRIVER, S.B., 1921.- Investigations on the nitrogenous metabolism of the higher plants. I. The Isolation of protein from leaves.- *Biochem.J.*, 15: 60.
- CHIBNALL, A.C., REES, M.W. and LUGG, J.W.M., 1963.- The amino acid composition of leaf proteins.- *J.Sci.Fd.Agric.*, 14: 234.
- CHOU, C.H., YEH, M.T., LIANG, C.C. and HUANG, C., 1977.- Quantity and composition of amino acids of leaf protein concentrates in five tropical leguminous plants.- *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 18:(2), 101-108.
- COLBURN, M.W. and EVANS, J.L., 1967.- Chemical composition of the cell-wall constituent and acid-detergent fiber fractions of forages.- *J.Dairy Sci.*, 50: 1130-1135.
- CONNELL, J. and FOXELL, P.R., 1976.- Green crop fractionation, the products and their utilization by cattle, pigs and poultry. *Biennial Reviews, National Institute for Research in Dairying*, 21-41.
- CONNELL, J. and HOUSGMAN, R.A., 1977.- The utilisation by ruminants pressed green crops from fractionation machinery. *Occasional Symposium. No. 9.*, British Grassland Society Ed. Wilkins, R.J., 57-64.
- CROOK, E.M., 1946.- The extraction of nitrogenous materials from green leaves.- *Biochem.J.*, 40: 197.
- CROOK, E.M. and HOLDEN, M., 1948.- Some factors affecting the extraction of Nitrogenous material from leaves of various species. *Biochem.J.*, 43: 181-185.
- CUENCA, C.L., y PONCE, P.A., 1975.- El problema de la producción (y consumo) de carne (y demás productos de origen animal) en el mundo.- *Zootechnia. Vol. XXIV(9-10)*, 419.

- CUENCA, C.L., 1976.- Necesidades protéicas del consumo humano, producción ganadera mundial y sus grandes campos de actuación. Zootechnia. Vol. XXV:(9-10-11-12), 377-412.
- DAVIES, M., EVANS, N.C. and PARR, W.M., 1952.- Biological values and digestibility of some grasses and protein preparations from young and mature species, by the Thomas-Mitchell Method, Using rats. Biochem.J., 52: XXiii.
- DAVYS, M.N.G. and PIRIE, N.W., 1969.- A laboratory scale pulper for leafy plant material., Biotechnology and Bioengineering., 11: 517.
- DAVYS, M.N.G., PIRIE, M.W. and STREET, G., 1969.- A laboratory-scale press for extracting juice from leaf pulp. Biotechnology and Bioengineering., 11: 528.
- DE FREMERY, D., MILLER, R.E., EDWARDS, R.H., KNUKLES, B.E., BICKOFF, E.M. and KOHLER, G.O., 1973.- Centrifugal separation of white and green protein from alfalfa juice. J.Agric.Fd.Chem., 21: 886-890.
- DESHMUKH, M.G., GORE, S.B., MUNIKAR, A.M. and JOSHI, R.N., 1974.- The yields of leaf protein from various short-duration crops. J.Sci.Fd.Agric., 25: 717-724.
- DEV, D.V., BATRA, J.R. and JOSHI, R.N., 1974.- The yields of extracted leaf protein from lucerne (Medicago sativa, L.), J.Sci.Fd. Agric., 25: 725-733.
- DIRECCION DE AGRICULTURA Y GANADERIA (Servicio de Horticultura), - 1972.- El cultivo del guisante. Diputación Foral de Navarra. (Boletín de divulgación).

- DUCKWORTH, J. and WOODHAM, A.A., 1961.- Leaf protein concentrates. I. Effect of source of raw material and method of drying on protein value for chicks and rats., J.Sci.Fd.Agric. 12: 5.
- DUQUE, F., 1971.- Determinación conjunta de fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre y zinc en plantas. Anal. Edafol. y Agrobiol. Tomo XXX: núms. 3-4. Madrid.
- EDWARDS, R.H., MILLER, R.E., FREMERY, D.De., KNUCKLES, B.E., BICKOFF, E. M. and KOHLER, G.D., 1975.- Pilot plant production of an edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa., J.Agric.Fd.Chem., 23: 620-626.
- EGGUM, B.O., 1970a.- Nutritional evaluation of protein by laboratory animals. Evaluation of Novel Protein products. Ed.by A.E. Bender et al. p. 117. Pergamon Press. Oxford.
- EGGUM, B.O., 1970b.- The protein quality of cassava leaves.- Brit. J.Nutri., 24: 761.
- ELLINGER, G.M. and PALMER, R., 1969.- The biological availability of methionine sulphoxide.- Proc.Nutri.Soc., 28: 42A.
- EMETARON, C.E., 1976.- The extractability of green plant substances as an index of cell rupture and its determination from the extract conductivity Ph.D. Thesis, University of Wisconsin. Madison.
- EREKY, K., 1927.- British Patent No. 270.629.
- FAFUNSO, M. and BYERS, M., 1977.- Effect of pre-press treatments of vegetation on the quality of the extracted leaf protein.- J.Sci.Fd.Agric., 28: 4.
- F.A.O., 1965.- Protein requirements. Nutr. Mtg. Rep. Ser. No. 37. Food and Agricultural Organization. Roma.

- FAUCONEAU, G., 1960.- Les fractions azotées et les acides organiques des Graminées et des Légumineuses.- Proceedings of the Eighth International Grassland Congress. Paper 88/2 617-621.
- FENSTESTEIN, G.N., 1961.- Extraction of protein from greenleaves., J.Sci.Fd.Agric., 12: 305-312.
- GALOPPINI, C., ANELLI, G., FLORENTINI, R. y MASSIOGMAN, L., 1976.- Procedimento per l'ottenimento di concentrati protein fogliari mediante coagulazione dei succhi di spremitura della erbe con polielettrolito.- Brevetto It nº 12438, A/76.
- GALOPPINI, C., FLORENTINI, R. y PACHETTI, P., 1978.- Leaf protein concentrate for animal feeding: Italian research and realization. In: 3rd World Congress on Animal Feeding. Vol. 7: Madrid. Spain, 23-27 october 1978. International Veterinary Association for Animal Production (1978). 477-481.
- GERLOFF, E.D., LIMA, I.H. and STAHMANN, M.A., 1965.- Amino acid composition of leaf protein concentrates., J. Agric.Fd.Chem., 13: 139.
- GOERING, H.K. and VAN SOEST, P.J., 1970.- Forage fiber analyser. Agriculture Handbook nº 379. United States Department of Agriculture.
- GONTZEA, I., FERRANDO, R. y SUTZESCO, P., 1968.- Substances antinutritives naturelles des aliments. Ed. Vigot Frères Paris. 6ª ed. 166 pp.
- GONZALEZ, G., 1964.- Técnicas normalizadas en Europa para el análisis rutinario de los alimentos del ganado. I. Determinación de la humedad, cenizas brutas, grasa bruta y proteína bruta.

- II. Determinación de la fibra bruta y del almidón.- Rev. de Nutr. Anim. Vol. II(2) 83-94 y (3) 147-161.
- GONZALEZ, G., OCIO, E., TREVINO, J., TORTUERO, F. y GONZALEZ, V., 1974.- Preliminary trials with Aragon and Du Puits alfalfas (Medicago sativa, L.) and hairy vetch (Vicia villosa Roth.) as sources of LPE. Proceedings of the 5th General Meeting. European Grassland Federation. 1973., 89-94.
- GONZALEZ, G., 1974.- La producción vegetal como fuente de energía y de proteínas alimentarias.- Rev. de la Universidad Complutense. Vol. XXIII (91), 41-65.
- GONZALEZ, G., RICHELET, A. y OCIO, E., 1977.- Efectos de la modificación del pH en el jugo de plantas, sobre la cantidad y la composición químico-bromatológica de los correspondientes concentrados proteínicos vegetales (CPV).- Rev. de Nutr. Anim. 15:(1), 15-21.
- GOODALL, C., 1936.- Improvements relating to the treatment of grass and other vegetable substances.- Brit. Pat. 457789.
- GOSWAMI, A.K. and WILLCOX, J.S., 1969.- J.Sci.Fd.Agric., 20: 592-595.
- HANCZAKOWSKI, P., 1974.- Effect of supplements of synthetic methionine and lysine on the feeding value of leaf protein concentrates.- Koczniki Naukowe Zootekniki. 1: 139-145.
- HARTMAN, G.H., AKESON, W.R. and STAHAMANN, M.A., 1967.- Leaf protein concentrate prepared by spray-drying.- J.Agric.Fd.Chem., 15: 74.
- HEATH, S.B. and KING, M.W., 1977.- The production of crops for green crop fractionation. Occasional Symposium No. 9, British Grassland Society. Ed. Wilkins, R.J., 9-21.

- HENRY, K.M., 1963.- The nutrition value of leaf proteins.- Proc. 6th Inst. Nutr. Congr. Edinburg., 492 p.
- HENRY, K.M. and FORD, J.E., 1965.- The nutritive value of leaf protein concentrate determined in biological tests with rats and determined by microbiological methods.- J. Sci. Fd. Agric., 16: 425.
- HENRY, Y. y RERAT, A., 1966.- Evolution de l'ingestion spontanée de principes energetiques en fonction de la vitesse de croissance et de la proteinogénèse chez le rat blanc. Amino acides, pepdies, proteines.. Cahier n° 6. A.E.C., Paris, 237-262.
- HORIGOME, T., 1977.- Nutritional studies on fractionated cytoplasmic and chloroplastic proteins from leaves of oats and ladino clover.- Japanese Journal of Zootechnical Science., 48: 267-272.
- HOVE, E.L., LOHREY, E., URS, M.K. and ALLISON, R.M., 1974.- The effect of Lucerne-protein concentrate in the diet of growth, reproduction and body composition of rats.- Brit. J. of - Nutri., 31: 147.
- HUDSON, B.J.F. and KARIS, I.G., 1973.- Aspects of vegetable structural lipids. 1. The lipids of leaf protein concentrate.- J. Sci. Fd. Agric., 24: 1541-1550.
- HUDSON, B.J.F. and KARIS, I.G., 1976.- Stability of lipids and proteins in leaf protein concentrates.- J. Sci. Fd. Agric., 27: 443-448.
- HUGHES, G.P. and EYLES, D.E., 1953a.- Extracted herbage leaf proteins for poultry feeding. I. Introduction and feeding trial with laying hens.- J. Agric. Sci., 43: 136.

- HUGHES,G.P. and EYLES,O.E., 1953b.- Extracted herbage leaf proteins for poultry feeding. II. The use of leaf protein in chick rations.- J.Agric.Sci., 43: 144.
- I.A.T.A., 1970.- Variedades de guisantes para industrialización y su cultivo.- Instituto de Agroquímica y Tecnología de los -- Alimentos. nº 6.
- JOSHI,R.N., 1971.- The yields of leaf protein that can be extracted from crops of Aurangabad, pp. 19-28, in: Leaf protein.- Edited by N.W. Pirie, Oxford U.K. IBP Handbook No. 20.
- KNUCKLES,B.E., BICKOFF,E.M. and KOHLER,G.O., 1972.- PRO-XAN process, methods for increasing protein recovery from alfalfa.- J. Agric.Fd.Chem., 20: 1055-1057.
- KOEGEL,R.G. and BRUHN,H.O., 1977.- Requirements for expression of plant juice. Occasional Symposium No. 9. British Grassland Society. Ed. Wilkins, R.J., 23-28.
- KOHLER,G.O. and GRAHAM,W.R.Jr., 1951.- A chick growth found in leafy green vegetation.- Ponet. Sci., 30: 484.
- KOHLER,G.O., CHRISMAN,J. and BICKOFF,E.M., 1973.- Separation of protein from fiber in forage crops. pp. 42-60 in: Alternative source of protein for animal production. National Academy of Sciences. Washington, D.C.
- KOHLER,G.O. and BICKOFF,E.M., 1974.- Leaf protein for food and feed use. Proc. 1974. Md. Nutr.Conf.Feed Manufact. pp.60-64. University of Maryland.
- KUZMICKY,KOHLER,G.O. and BICKOFF,E.M., 1972.- Utilisation of Pro-Xan as protein source for broilers, pp. 58-65, in: Eleventh Technical alfalfa Conference Proceedings, ARS-USDA.

- ALEXANDER, K., CARLSSON, R., SCHALEN, V., SIMONSSON, A. and LUNDBORG, T., 1970.- Quantities and qualities of leaf protein concentrates from wild species and crop species grown under controlled conditions.- *Ann. Appl. Biol.*, 66: 193.
- LIENER, I.E., 1980.- Toxic constituents of plant foodstuffs. Ed. Academic Press. New York and London.
- LIMA, I.H., RICHARDSON, T. and STAHMANN, M.A., 1965.- Fatty acids in some leaf protein concentrates.- *J. Agric. Fd. Chem.*, 13: 143.
- LOHREY, E., TAPPER, B. and HOVE, E.J., 1974.- Photosensitization of albino rats fed lucerne protein concentrate.- *Brit. J. of Nutrition.*, 31: 159.
- LUGG, J.W.H., 1939.- The representativeness of extracted samples and the efficiency of extraction of protein from the fresh leaves of plants and some partial analyses of the whole proteins of leaves.- *Biochem. J.*, 33A: 110.
- LUGG, J.W.H. and WELLER, R.A., 1948.- Protein in senescent leaves of Trifolium subterraneum: partial amino acid composition.- *Biochem. J.*, 43: 412.
- MCKENZIE, D.R., 1977.- Yields of protein extracted from a range of Northern Victorian herbage. & *Aus. J. of Exp. Agric. and Anim. Husbandry.*, 17: 268-276.
- MORENO, R., CRESPO, F. y SANCHEZ-VIZCAINO, E., 1976.- El Pisum sativum (var. K-129 y K-248) como alimento para rumiantes. *Zootecnia.* XXV:(4-5-6) 179-191.
- MOORE, S., 1963.- On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, 238: 235-237.
- MORRIS, T.R., 1977.- Leaf protein concentrate for non-ruminant farm

- animals. Occasional Symposium No. 9. British Grassland Society. Ed. Wilkins, R.J., 67-82.
- MORRISON, J.E. and PIRIE, N.W., 1961.- The large-scale extraction of protein from leaf extracts.- J.Sci.Fd.Agric., 12: 1-3.
- NANDA, G.L., KONDOS, A.C. and TERNOUTH, J.H., 1975.- An improved technique for plant protein extraction.- J.Sci.Fd.Agric., 26: 1917-1924.
- NANDA, C.L., TERNOUTH, J.H. and KONDOS, A.C., 1977.- Evaluation of the nutritive value of plant protein concentrates.- J.Sci.Fd. Agric., 28: 1075-1079.
- OCIO, E., 1961.- Fundamentos teóricos y disposición experimental para la determinación del valor biológico de las proteínas en ratas jóvenes por el método de Thomas-Mitchell. Cuadernos de Nutrición Animal. 5, 2-24. Antibióticos, S.A. Madrid.
- OELSHLEGEL, F.J.Jr., SCHROEDER, J.K. and STAHMANN, M.A., 1969a.- Potential for protein concentrates from alfalfa and waste green plant material.- J.Agric.Fd.Chem., 17: 791.
- OELSHLEGEL, F.J.(Jr), SCHROEDER, J.R. and STAHMANN, M.A., 1969b.- Protein concentrates: use of residues as silage.- J.Agric. Fd.Chem., 17: 796-798.
- OSBORNE, T.B. and MENDEL, L.B., 1917.- The relative value of certain proteins and protein concentrates as supplements to corn gluten.- J.Biol.Chem., 29: 69-92.
- OSBORNE, T.B. and WAKEMAN, A.J., 1920.- The proteins of green leaves. I. Spinach leaves.- J.Biol.Chem., 42: 1.
- OSBOURN, D.F., TERRY, R.A., DOUTEN, G.E., CAMMELL, S.B. and LANSLEY, P.R., 1971.- Chemical and in vitro digestion procedures for

the prediction of the digestibility of forage crops by sheep. Proc.Nutr.Soc., 30: 85-86A.

OSTROWSKY, H.T., 1976.- Pasture production in a protein extraction system. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 36: 30-41.

PEREZ, J.M., LEUILLET, M. y BOURDON, D., 1979.- Les pois dans l'alimentation du porc. Techn. Porc. 2: 2.

PIERPOINT, W.S., 1969a.- O-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acid and peptides.- Biochem. J., 112: 609.

PIERPOINT, W.S., 1969b.- O-Quinones formed in plant extracts. Their reaction with bovine serum albumin.- Biochem. J., 112: 619.

PIRIE, N.W. (Ed.), 1971.- Leaf protein: its agronomy, preparation, quality and use.- Oxford U.K., BLACKWELL Scientific Publications IBP Handbook, nº 20. 192 p.

PIRIE, N.W., 1975.- Leaf protein. pp. 133-139. in: New protein sources. Ed. N.W. Pirie. Rothamsted Experimental Station. Harpenden. U.K.

PIRIE, N.W. Ed., 1975.- Food protein sources. Cambridge University Press. Cambridge. U.K.

PIRIE, N.W., 1978.- Leaf protein and other aspects of fodder fractionation. Cambridge University Press.

RAYMOND, W.F. and HARRIS, C., 1957.- The value of the fibrous residue from leaf protein extraction as a feedingstuff for ruminants.- J.Br.Grassland Soc., 12: 166.

RIVADULLA BUIRA, A., 1978.- Las proteínas foliares recurso del futuro inmediato en la alimentación animal. III Congreso Mundial de Alimentación Animal. Madrid, octubre, 1978. 79-84.

- RIVADULLA GRACIA, J.P., 1978.- Aplicaciones tecnológicas del fraccionamiento de la alfalfa y plantas jóvenes. III Congreso Mundial de Alimentación Animal. Madrid, octubre 1978. 335-346.
- RODRIGO, M., NAVARRO, A., VAYA, J.L. y RUIZ FELIPE, P.- Estudio de industrialización de variedades de guisantes. Navarra y Murcia (1971-1972). Asociación de Investigación de Conservas Vegetales. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos. Valencia.
- SANCHEZ-VIZCAINO, E., HERNANDEZ ROCA, C. y SMILG, N., 1971.- Los subproductos vegetales de la industria conservera en alimentación animal.- Rev.Nutri.Anim. IX:(4), 197-207.
- SHEPPERSON, G., CONNELL, J., HEATH, S.B. and HOUSEMAN, R.A., 1977.- The performance of the machinery at present available for the expression of juice from forage crops. Occasional Symposium No. 9. British Grassland Society. Ed. Wilkins. 29-37.
- SHURPALEKAR, K.S., SINGH, N. and SUNDARAVALLI, O.E., 1969.- Nutritive value of leaf protein from lucerne (Medicago sativa, L.): growth responses in rat at different protein levels and to supplementation with lysine and/or methionine.- Indian J. Exp. Biol., 7: 279-280.
- SMITH, A.M. and AGIZA, A.H., 1951.- The amino acids of several grassland species, cereals and bracken.- J.Sci.Fd.Agric. 2:503.
- SPACKMAN, D.M., STEIN, W.H. and MOORE, S., 1958.- Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal.Chem., 30: 1190-1206.
- SPENCER, R.R., MOTTOLA, A.L., BICKOFF, E.M., PETER CLARK, J. and KOHLER, G.O., 1971.- J.Agric.Fd.Chem., 19: 504.

- STEWART, F.C., WHETMORE, R.M., THOMPSON, J.F. and NITSCH, J.P., 1964.-
A quantitative chromatographic study of nitrogenous components of shoot apices.- Am.J.Bot., 41: 123.
- SUBBA RAU, B.M., MAHADEVIAH, S. and SING, N., 1969.- Nutritional studies on whole-extract coagulated leaf protein and fractionated chloroplastic and cytoplasmic proteins from lucerne (Medicago sativa).- J.Sc.Fd.Agric., 20: 355-358.
- SUBBA RAU, B.H. and SING, N., 1970.- Studies on nutritive value of leaf protein from lucerne (Medicago sativa L.) 2. Effect of processing conditions.- Indian J.Exp.Biol. 8: 34-36.
- SUBBA RAU, B.H., RAMAN, K.J.R. and SING, N., 1972.- Studies on nutritive value of leaf protein and some factors affecting their quality.- J.Sci.F.Agric., 23: 233-245.
- TILLEY, J.M.A. and TERRY, R.A., 1963.- A two stage technique for the "in vitro" digestion of forage crops.- J.Brit.Grassl.Soc. 18: 104.
- TREVINO, J. y HERNANDEZ, M.T., 1978.- Efecto del estado de madurez de la planta sobre la composición de la fracción nitrogenada de la alfalfa Aragon (Medicago sativa, L.) Rev. Pastos. 8:(1) 133-139.
- VAN SOEST, P.J., 1965.- Comparison of two different equations for prediction of digestibility from cell contents, cell-wall constituents and the lignin content of acid-detergent fiber.- J.Dairy Sci., 48: 815.
- VAN SOEST, P.J. and WINE, R.M., 1967.- Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. J. Ass. Off. Anal. Chem., 50: 50-55.

- VAN SOEST, P.J. and WINE, R.H., 1968.- The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. J.Ass.Off.Anal.Chem., 51: 780-785.
- VARELA, G., GARCIA, D. y MOREIRAS, O., 1971.- La nutrición de los españoles.- Ed. Publ. de la Esc. Nac. de Adm. Pública. Madrid.
- VARTHA, E.W., FLETCHER, L.R. and ALLISON, R.M., 1973.- Protein extracted herbage for sheep feeding. New Zealand Journal of Experimental Agriculture., 1: 171-174.
- WACHTER, H.H. de VISSCHER, G., 1978.- Approvisionnement en matières premières destinées à l'alimentation animale de la Communauté Economique Européenne. II. Congreso Mundial de Alimentación Animal. Madrid. octubre 1978. 17-25.
- WALTER, W.M., Jr., PURCELL, A.E. and MCCOLLUM, G.K., 1978.- Laboratory preparation of a protein-xanthophyll concentrate from sweet potato leaves.- J.Agric.Fd.Chem., 5: 1222-1226.
- WILKINS, R.J., Ed., 1977.- Green crop fractionation. Occasional Symposium No. 9, Brit.Grassland Society and Brith. Soc. of Animal Production. Grassland Research Institute, Hurley, Maidenhead, U.K.
- WILSON, R.F. and TILLEY, J.M.A., 1965.- Amino acid composition of lucerne and grass protein preparation.- J.Sci.Fed.Agric., 16: 1973.
- WOLDEGIORGIS, G., 1976.- Protein nutritional quality studies of leaf protein concentrates from alfalfa (Medicago sativa L.) and processed food.- Dissertation Abstracts International, B. 37:(6) 2776.

WOODHAM, A.A., 1965.- The nutritive value of leaf protein concentrates.- Proc.Nutri.Soc., 24: XXIV.

WOODHAM, A.A. and DAWSON, R., 1968.- The nutritive value of ground-nut proteins. I. Some effects of heat upon nutritive value, protein composition and enzyme inhibitory activity. Br. J. Nutri. 22: 589.

